

Doktori értekezés Ph.D. fokozat elnyerésére



# CSATOLT TECHNIKÁK FEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA ARZÉNMODOSULATOK MEGHATÁROZÁSÁRA

SCHÄFFER RICHÁRD

doktori (Ph.D.) értekezése

Készült:  
Budapesti Corvinus Egyetem  
Alkalmazott Kémia Tanszék

Budapest, 2007

**A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszer-tudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** **Dr. Fodor Péter**  
Egyetemi tanár  
az MTA doktora  
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM  
Élelmiszertudományi Kar,  
Alkalmazott Kémia Tanszék

**Témavezető:** **Dr. Fodor Péter**  
Egyetemi tanár  
az MTA doktora  
BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM  
Élelmiszertudományi Kar,  
Alkalmazott Kémia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

Az Iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2007.06.12-ki határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:**

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

**Elnöke**

Biacs Péter, DSc

**Tagjai**

Hoschke Ágoston, CSc

Kovács Béla, PhD

Rácz László, CSc

**Opponensek**

Bartha András, PhD

Szabó Pál, PhD

**Titkár**

Stefánka Zsolt, PhD

# Tartalomjegyzék

<b>1</b>	<b>BEVEZETÉS.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>	<b>9</b>
2.1	AZ ARZÉN KÉMIAI TULAJDONSÁGAI .....	9
2.2	ARZÉN A KÖRNYEZETBEN .....	9
2.3	AZ ARZÉNVEGYÜLETEK NEVEZÉKTANA .....	10
2.4	AZ ARZÉN BIOLÓGIAI JELENTŐSÉGE .....	13
2.5	AZ ARZÉN MÓDOSULATANALITIKÁJÁNAK HAJNALA.....	15
2.6	A KORSZERŰ ARZÉN MÓDOSULAT-ANALITIKA .....	17
2.6.1	<i>Mintavétel, mintaelőkészítés az arzénspeciációban.....</i>	<i>17</i>
2.6.1.1	Mintavétel .....	17
2.6.1.2	Arzén vegyületek stabilitása .....	18
2.6.1.3	Mintaelőkészítés teljes arzéntartalom meghatározásához.....	19
2.6.1.4	Mintaelőkészítés az arzénmódosulatok meghatározására.....	20
2.6.2	<i>Az arzénspeciációban alkalmazott elválasztástechnikai módszerek.....</i>	<i>23</i>
2.6.2.1	Ioncserés kromatográfia.....	23
2.6.2.2	Fordított fázisú ionpárhépző kromatográfia.....	26
2.6.2.3	Ionkizárásos és méretkizárásos kromatográfia .....	28
2.6.3	<i>Detektálási módszerek az arzénspeciációban.....</i>	<i>29</i>
2.6.3.1	Hidridképzéses - atomfluoreszcens - spektrométer (HG-AFS) .....	30
2.6.3.2	Induktív csatolású plazma tömegspektrométer (ICPMS) .....	33
2.6.3.3	Molekula tömegspektrométer .....	35
2.6.4	<i>Minőségbiztosítás az arzén módosulatanalitikájában .....</i>	<i>37</i>
2.6.4.1	Standard oldatok az arzénspeciációban.....	37
2.6.4.2	Módszerek validálása.....	38
2.6.4.3	Hiteles anyagminták használata .....	39
2.6.4.4	Teljes anyagmérleg készítése.....	41
2.7	ARZÉNSPECIÁCIÓ VÍZI KÖRNYEZETEK BEN.....	43
2.7.1	<i>Arzénspeciáció tengeri eredetű mintákban.....</i>	<i>43</i>
2.7.2	<i>Arzénspeciáció édesvízi eredetű mintákban.....</i>	<i>45</i>
<b>3</b>	<b>CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>ANYAG ÉS MÓDSZER.....</b>	<b>51</b>
4.1	VIZSGÁLATOK SORÁN ALKALMAZOTT VEGYSZEREK, STANDARD OLDATOK ÉS REFERENCIA ANYAGOK .....	51
4.2	TELJES ARZÉNTARTALOM MEGHATÁROZÁSÁHOZ VÉGZETT MINTAELOKÉSZÍTÉS.....	52
4.3	TELJES ARZÉNTARTALOM MEGHATÁROZÁSÁRA ALKALMAZOTT MÉRŐRENDSZEREK.....	53
4.4	ARZÉN MÓDOSULATOK MEGHATÁROZÁSÁHOZ VÉGZETT MINTAELOKÉSZÍTÉS .....	54
4.5	ARZÉN MÓDOSULATOK ELVÁLASZTÁSÁRA ALKALMAZOTT MÓDSZEREK .....	54
4.6	ARZÉN MÓDOSULATOK MEGHATÁROZÁSÁRA ALKALMAZOTT KAPCSOLT ANALITIKAI RENDSZEREK .....	55
4.6.1	<i>HPLC-(UV)-HG-AFS kapcsolt rendszer.....</i>	<i>55</i>
4.6.2	<i>HPLC-ICPMS kapcsolt rendszer .....</i>	<i>57</i>
4.6.3	<i>HPLC-ESMS/MS kapcsolt rendszer.....</i>	<i>57</i>
<b>5</b>	<b>EREDMÉNYEK.....</b>	<b>59</b>
5.1	ELVÁLASZTÁSTECHNIKAI MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE.....	59
5.1.1	<i>Arzénmódosulatok meghatározása HPLC-(UV)-HG-AFS csatolt rendszerrel</i>	<i>59</i>

5.1.1.1	Kationos arzénkomponensek elválasztásának kidolgozása.....	59
5.1.1.2	Anionos arzénkomponensek elválasztásának kidolgozása .....	62
5.1.2	<i>Arzénmódosulatok meghatározása HPLC-ICPMS csatolt rendszerrel .....</i>	<i>63</i>
5.1.2.1	Kationos arzénkomponensek elválasztásának kidolgozása.....	63
5.1.2.2	Anionos arzénkomponensek elválasztásának kidolgozása .....	65
5.1.3	<i>Arzénmódosulatok meghatározása HPLC-ESMS/MS csatolt rendszerrel .....</i>	<i>67</i>
5.1.3.1	Detektálási paraméterek optimalása .....	67
5.1.3.2	Kationos arzénkomponensek elválasztásának kidolgozása.....	72
5.1.3.3	Anionos arzénkomponensek elválasztásának kidolgozása .....	74
5.1.3.4	A nem megfelelő elválasztásból eredő azonosítási hibák .....	77
5.2	KÖRNYEZETI MINTÁK ARZÉNSPECIÁCIÓS ELEMZÉSE .....	81
5.2.1	<i>Tengeri eredetű élelmiszerek arzénspeciációs elemzése HPLC-UV-HG-AFS rendszerrel.....</i>	<i>81</i>
5.2.1.1	Mintavétel.....	81
5.2.1.2	Mintaelőkészítés .....	83
5.2.1.3	Teljes arzéntartalom meghatározása .....	83
5.2.1.4	Módosulatanalitikai vizsgálatok.....	86
5.2.1.5	Minőségbiztosítás .....	88
5.2.2	<i>Édesvízi tápláléklánc egyedeinek arzénspeciációs vizsgálata HPLC-ICPMS rendszerrel.....</i>	<i>89</i>
5.2.2.1	Mintavétel.....	89
5.2.2.2	Mintaelőkészítés .....	90
5.2.2.3	Teljes arzéntartalom meghatározása .....	90
5.2.2.4	Extrakciós hatások, anyagmérleg.....	92
5.2.2.5	Módosulatanalitikai vizsgálatok.....	94
5.2.2.6	Minőségbiztosítás .....	101
5.2.2.7	Édesvízi kontra tengeri szervezetek, általános következtetések .....	101
5.2.3	<i>HPLC-ESMS/MS kapcsolt technika alkalmazási lehetőségei környezeti minták arzénmódosulatainak meghatározására .....</i>	<i>103</i>
5.2.3.1	Mintaelőkészítés .....	103
5.2.3.2	Arzénmódosulatok minőségi vizsgálata HPLC-ESMS/MS módszerrel ....	103
5.2.3.3	Minőségi vizsgálatok minőségbiztosítása HPLC-ESMS/MS esetén .....	106
5.2.3.4	Arzénmódosulatok mennyiségi vizsgálata HPLC-ESMS/MS módszerrel	107
5.2.3.5	Következtetések .....	111
5.2.4	<i>BCR-710 referencia minta arzénmódosulatainak teljes jellemzése .....</i>	<i>112</i>
5.2.4.1	Mintaelőkészítés .....	113
5.2.4.2	Eredmények.....	113
6	<b>ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>117</b>
7	<b>ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>119</b>
8	<b>SUMMARY.....</b>	<b>121</b>
9	<b>IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>123</b>



## **1 BEVEZETÉS**

Az arzén, melynek hírnevét beárnyékolja az évszázadokon át gyilkos szerként való alkalmazása, talán az egyetlen elem, amelynek neve nem csupán elválaszthatatlanul összeforrt a mérgezés fogalmával, hanem szinonimájává is vált. Íztelen, szagtalan tulajdonsága miatt a „fehér arzén” néven elhíresült arzén-trioxid méltán érdemelte ki a „mérgek királya-királyok mérge” elnevezést. Albertus Magnus, a természeti és természetfeletti tudományok iránt egyaránt elkötelezett domonkosrendi szerzetes 1250 körül fedezte fel és különítette el először az arzént elemi állapotában. Az arzén rossz hírnevének értelmetlen voltát megerősítették azok a korai kutatások, melyek során felismerték előnyös tulajdonságait is. A legjobb példa erre a szifilisz betegek kezelésére használt Salvarsan nevű, szerves arzéntartalmú antibiotikum, melynek kifejlesztése Paul Ehrlich (1854-1915) és Sachahiro Hata (1873-1938) nevéhez fűződik.

A kutatók már a XX. század elején felismerték, hogy egyes elemeknek a szervezetre gyakorolt hatása koránt sem egyértelmű, hiszen azok hatásmechanizmusa függ az adott elem oxidációs állapotától, kémiai formájától. Az analitikai kémia azon viszonylag új ágát, amely az elemek teljes koncentrációja helyett azok különböző szerves illetve szervetlen kötésben jelen levő úgynevezett módosulatainak minőségi és mennyiségi vizsgálatát tűzte ki célul, módosulatanalitikának, vagy más szóval speciációs analitikának nevezzük.

A tengeri eredetű élelmiszerek jelentős arzéntartalmát már több mint 80 éve felismerték. A speciációs szemlélet kialakulása mégis egészen 1977-ig váratott magára, amikor is Edmonds és munkatársai (EDMONDS, 1977) egy addig ismeretlen, az emberi szervezetre ártalmatlan szerves arzénkomponenst (arzenobetaint) izoláltak egy tengeri rák fajból. Ezzel az áttörő eredménnyel vette kezdetét az a kutatási hullám, amely elsődleges feladatának tekintette a természetben előforduló különböző arzéntartalmú vegyületek azonosítását és feltérképezését. Az arzenobetain felfedezése után számos olyan kutatási eredmény látott napvilágot, melyek egyhangúan bebizonyították, hogy a tengeri rákokon kívül a kagylók és halak arzéntartalmának jelentős hányadát az újonnan felfedezett vegyület alkotja. A több mint 20 éves kutatási eredmények ismeretében a tengeri eredetű élelmiszerekre vonatkozó arzén határértékeket eltörölték. Azonban a tengeri élőlényekkel ellentétben a tenger- és édesvíz túlnyomó részben szervetlen, az emberi szervezet számára erősen mérgező arzénkomponenseket (arzenitet, arzenátot) tartalmaz. Ez azt a kérdést veti fel, hogy a tengeri szervezetek szervetlen arzén akkumuláló és átalakító képessége hogyan vetíthető tovább bonyolultabb biológiai rendszerekre. Magyarországon főleg a dél-alföldi régió ivóvízkészletének magas arzéntartalma jelent problémát, ahol az EU csatlakozással újonnan bevezetett 10 µg/L arzén határérték betartása komoly kihívást jelent a vízművek számára.

Az arzén módosulatanalitikájának fejlődésével mára már több tucat, a természetben előforduló arzéntartalmú molekulát ismerünk, és feltehetően számuk még növekedni fog. Jelentős hányaduk toxikológiai tulajdonsága azonban még ismeretlen. A kimutatható arzénkomponensek egyre növekvő száma és azok eltérő toxicitása új, szelektívebb és érzékenyebb módszerek kidolgozását követeli meg az analitikus társadalomtól.

A speciációs analitikai módszerek főként csatolt rendszerek, ahol valamilyen elválasztástechnikát csatolnak egy arzén detektálására is alkalmas készülékhez. A módosulatanalitika egyik sarkalatos pontja az elválasztás és a detektálás mellett a mintaelőkészítés. A meghatározandó specieszek gyakran instabil vegyületek (tárolási körülményekre és beavatkozásokra nagyon érzékenyek), ezért eredeti állapotban tartásuk nehéz feladat a mintaelőkészítés során. A módszer fejlesztésénél törekednünk kell arra, hogy a meghatározás érdekében tett lépések egyike se változtassa meg a meghatározandó speciesz eredeti formáját. Az arzénmódosulatok elválasztására a HPLC technikák terjedtek el leginkább. Ezek általában fordított fázisú ionpárpépzős, illetve ioncserés kromatográfiás módszerek. Mára már döntően az ioncserés kromatográfia javára billent át a mérleg nyelve. Az elválasztástechnikai módszerek egyre szelektívebbek és hatékonyabbak, így egyre több arzénkomponens egymás melletti egyidejű meghatározása válik lehetővé.

Az 1980-as években főként a láng-atomabszorpciós (FAAS) detektorok terjedtek el, majd később egyre népszerűbbé váltak az egyéb elemszelektív, optikai detektorok, mint az atomfluoreszcens (AFS) és az atomemissziós (AES) spektrométerek. Ezeket a technikákat döntően hidridképzéssel alkalmazták, mely az érzékenység javulásán túl a nem kívánt mátrix eliminálásával a korábbiaknál szelektívebb meghatározást tett lehetővé. Az induktív csatolású plazma (ICP) technikák és a tömegspektrometriás analizátorok megjelenésével az arzénspeciációs módszerek kidolgozása is új fordulatot vett. Az alacsony kimutatási határnak, multieleemes detektálási képességének és a nagy dinamikus tartományának köszönhetően az arzénmódosulatok vizsgálata terén a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia induktív csatolású plazmatömegspektrométer (HPLC-ICPMS) csatolás mára a legelterjedtebb módosulatanalitikai módszerré nőtte ki magát.

A módosulatanalitikában alkalmazott módszerek fejlődését indukálta a speciációs célokra készített hiteles anyagminták (CRM) megjelenése. A teljes arzéntartalmon felül a különböző arzénkomponensekre is hitelesített anyagminták alkalmassá váltak a különféle arzénmódosulatok vizsgálatára kifejlesztett módszerek validálására. Az arzén módosulatanalitikájának fejlődése töretlen, melynek köszönhetően egyre jobban megismerhetjük az arzén környezeti körforgásban betöltött helyét, lebontási folyamatait, valamint a különböző módosulatok egészségre gyakorolt hatását.



## 2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 Az arzén kémiai tulajdonságai

Az arzén a periódusos rendszer 5. főcsoportjának 3. eleme. Elnevezése görög eredetű: arzenikosz, jelentése vakmerő. Az arzén relatív atomtömege 74.9216. Csak egy stabil izotópja létezik ( $^{75}\text{As}$ ). Elektronkonfigurációja  $[\text{Ar}](3d)^{10}(4s)^2(4p)^3$ , oxidációs száma vegyületeiben +5, +3 és -3 lehet. Elektronegativitása 2.0, ionizációs energiája 5.825 ( $(4p)^3$ ) és 16.361 ( $((4s)^2(4p)^3)$ ) MJ mol $^{-1}$ . Az arzén a fémek és a nemfémek közötti átmenetet képviselő félfémek csoportjába tartozó elem. Stabil módosulata fémes jellegű. Az arzén több allotrop módosulat formájában létezik, bár az allotrópia nem olyan kiterjedt, mint a foszfor esetében. Az arzén száraz levegőn stabilis, nedves levegőn azonban oxidálódik a felülete, narancs-bronz felületi hártya keletkezik, amely további érintkezés hatására fekete színű bevonattá változik. Levegőn hevítve szublimál és fokhagymaszagú mérgező tulajdonságú  $\text{As}_2\text{O}_3$ -dát oxidálódik. Fémekkel arzenideket képez (pl.  $\text{CoAs}_3$ ), fluorban lánggra lobban és  $\text{AsF}_5$  keletkezik, más halogenidekkel arzén-trihalogenidek képződnek, oxidáló közegben diarzén-trioxid ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), valamint diarzén-pentoxid ( $\text{As}_2\text{O}_5$ ) keletkezik. Az oxidokat vízben oldva arzénessav ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ) és arzénsav ( $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ) keletkezik. Az arzén elektronszerkezetében három párosítatlan elektron található. Egy elektron felvételéhez az elektronegativitás értéke igen nagy, a további elektronok felvétele ellen azonban jelentős Coulomb-féle taszítás hat, következésképpen az  $\text{As}^{3-}$ -ion képződése erősen endoterm folyamat. Ilyen vegyületre példa az arzén-hidrid ( $\text{AsH}_3$ ), mely csak erős hidridképző ágens (pl.  $\text{NaBH}_4$ ) jelenlétében képződik. A szabad elem fémszerű jellege ellenére az arzén ionizációs energiái és elektronegativitása a foszforéhoz hasonló, ezáltal könnyen képez erős kovalens kötést a legtöbb nemfémes elemmel. Sokféle szerves vegyületet képez mind +3-as, mind +5-ös oxidációs állapotban. Kémiai reakciókban mind telített gyűrűs, mind aromás, mind alkilezett szerves származékai előállíthatók.

### 2.2 Arzén a környezetben

Az arzén előfordulásáról már számos összefoglaló tanulmány született (CULLEN, 1989; FRANCESCONI, 1997; FRANCESCONI, 2002b; KUEHNELT, 2003a), melyek átfogó képet adnak a környezetünkben található arzénkomponensekről és azok mennyiségéről. Az arzén a földkéregben átlagosan 2-3 mg/kg mennyiségben található. Általában olyan ásványokban fordul elő, melyek szulfidot, rezet, nikkelt, ólmot vagy kobaltot is tartalmaznak. Legelterjedtebb

ásványa az arsenopirit ( $\text{FeAsS}$ ) (CULLEN, 1989). Az arzén a természetes vizekbe a vízbázissal érintkező geológiai formációkból lassú oldódási folyamat során kerül. A talaj és a kőzetek eróziója során kialakult arsenit ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) és arsenát ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) az édes- és tengervizek legelterjedtebb arsenvegyületei. Míg az édesvizek arsenáttartalma tág határok között ( $1\text{--}200\text{ }\mu\text{g/L}$ ) ingadozik, addig a világ tengereinek, óceánjainak arsenáttartalma átlagosan  $1\text{--}5\text{ }\mu\text{g/L}$  (FRANCESCONI, 1997). Az említett két arsenkomponens könnyedén átalakulhat egymásba, arányukat a redox viszonyok és a biológiai aktivitás döntően befolyásolják. A szervesetlen arsenmódosulatokon kívül a tengervízben feltehetően biológiai aktivitás eredményeként kis mennyiségben metil-arzenát ( $\text{MA}^{\text{V}}$ ) és dimetil-arzinát ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) is található (ANDREAE, 1978).

A tengeri élőlényekben az arzén nagymértékben felhalmozódik és akár több száz  $\text{mg/kg}$  mennyiségben is megtalálható. Feltehetően a foszfáttal mutatott hasonlóságának köszönhetően a tengeri algák képesek a vízben található arsenát felvételére, melyet a méregtelenítési folyamatok során úgynevezett arsenocukrokká alakítanak (FRANCESCONI, 1997). Míg a tengeri algák és az azokat fogyasztó alacsonyabb rendű élőlények (kagylók) arsenáttartalmának legnagyobb hányadát az arsenocukrok teszik ki, addig a többi tengeri élőlényben ezek az arsenmódosulatok csak nyomokban találhatók meg (FRANCESCONI, 2002a). Ebben az esetben a domináns arsenvegyület az arsenobetain (AB).

Általánosságban kijelenthető, hogy a szárazföldi és az édesvízi szervezetek arsenakkumuláló képessége nagymértékben elmarad a tengeri szervezetekhez képest. Az arsenmódosulatok eloszlását tekintve azonban még ellentmondásosak az eredmények. Egyes vizsgálatok azt mutatják, hogy az édesvízi élőlények domináns arsenkomponense szintén az AB (SHIOMI, 1995), míg más tanulmányok szerint AB egyáltalán nincs jelen az édesvízi ökoszisztémában (LAWRENCE, 1986). Az utóbbi esetben, a mintában található arzén legnagyobb hányada ismeretlen módosulatok formájában volt jelen.

Az arzén részben a talajról, részben természeti jelenségek (vulkánkitörés) révén, főként szervesetlen arsenmódosulatok formájában jut a levegőbe. A legjelentősebb levegőszennyezést az ipari tevékenység okozza (fémkohászat, peszticidek, tüzelőanyagok). A levegő arsenáttartalma az emissziótól függően széles határok közt ingadozik ( $1\text{--}1000\text{ ng/m}^3$ ), a nem szennyezett területeken átlagosan  $0.4$  és  $30\text{ ng/m}^3$  között váltakozik (WHO, 1996).

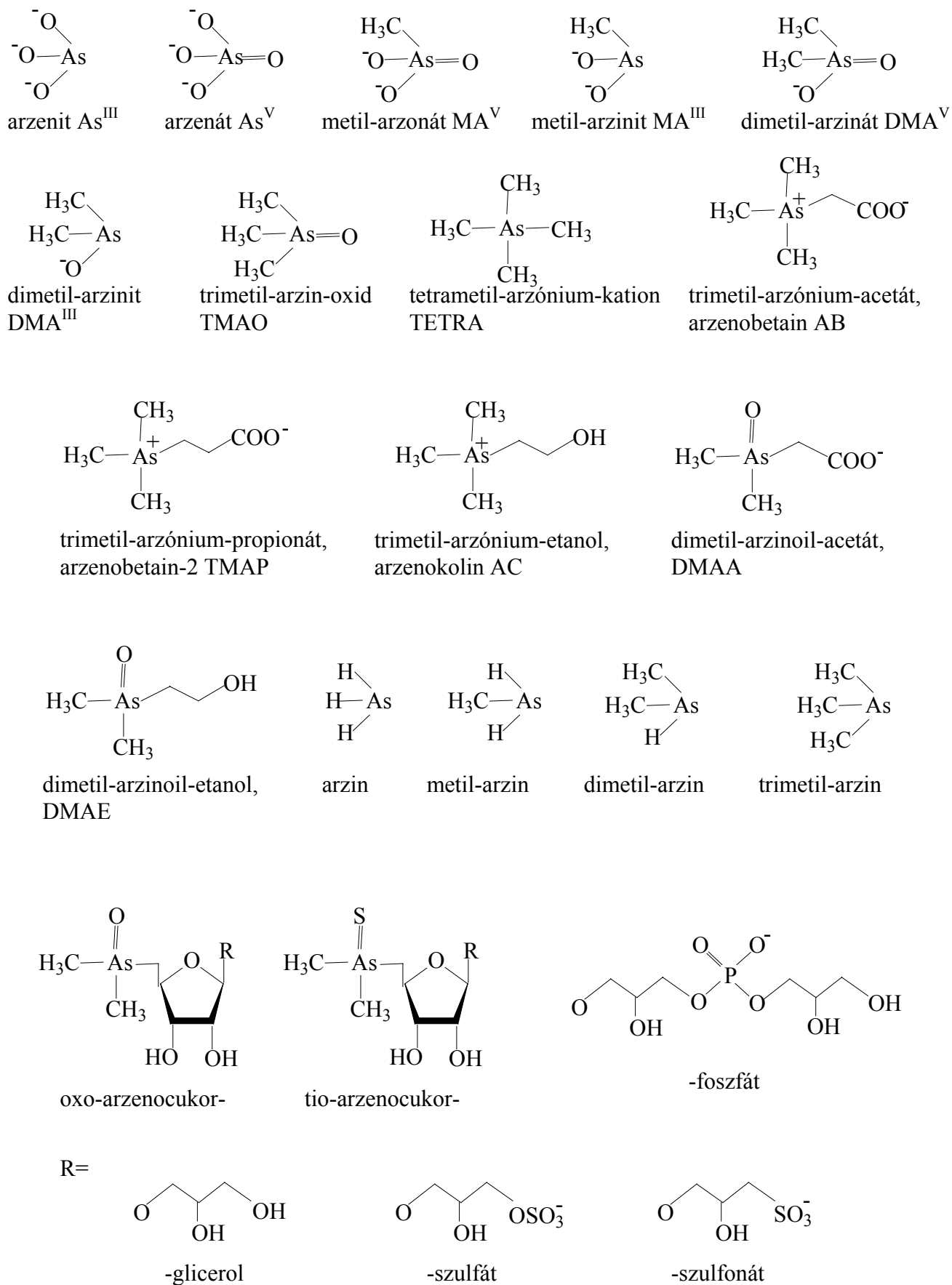
## 2.3 Az arsenvegyületek nevezéktana

Az **1. ábrán** a leggyakrabban előforduló arsenkomponensek kémiai szerkezetét, nevét és nevének rövidítését tüntettem fel. Az arsenvegyületek elnevezése és azok rövidítése még nem

teljesen tisztázott terület, sok kutatócsoport eltérő, sajátos rövidítéseket vezetett be. Az elnevezések sokfélesége zavart okozhat a rendelkezésre álló irodalmak kulcsszavakra épülő keresése során. Fontosnak véltem ezért a dolgozat folyamán említett arzénkomponensek nevének és rövidítésének rögzítését. Legtöbbször nem létezik valódi érv egyik-másik elnevezés mellett, sok esetben az elnevezések különböző terminológiai rendszert követnek.

A környezetben és különféle biológiai rendszerekben előforduló arzénkomponensek nagyrésze ionos formában található, meghatározásuk leggyakrabban ioncserés vagy ionpárpépzős kromatográfiás elválasztáson alapul. Hasonlóan a témával foglalkozó tanulmányok többségéhez, az **1. ábrán** a vegyületek deprotonált formáját és elnevezését tüntettem fel. Abban az esetben, ahol az adott komponens több protont is képes leadni, a molekula leginkább deprotonált alakja látható (pl.  $\text{AsO}_4^{3-}$  a  $\text{HAsO}_4^{2-}$  és a  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  helyett). Ezt a gondolatmenetet követi az arzenit ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) és arzenát ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) elnevezése is. Az egyszeresen és kétszeresen metilált arzén-specieszek rövidítésére sok esetben használják az MMAA és DMAA rövidítéseket, melyek a protonált vegyületformák angol elnevezéseinek (monometil-arzonsav és dimetil-arzinsav) rövidítéséből ered. Mivel a dimetil-arzinoil-acetátot is DMAA-val szokták jelölni, a rövidítések félrevezethetik az olvasót. A dolgozat folyamán az  $\text{MA}^{\text{V}}$  illetve  $\text{DMA}^{\text{V}}$  rövidítéseket fogom alkalmazni, melyek szintén a deprotonált formák (metil-arzonát és dimetil-arzinát) elnevezéséből származnak. Ezen metilált arzénkomponensek redukált, háromvegyértékű formáinak a rövidítése  $\text{MA}^{\text{III}}$  (metil-arzonit) és  $\text{DMA}^{\text{III}}$  (dimetil-arzinit).

Az AB és AC rövidítéseket javaslom az arzenobetain és az arzenokolin esetében. Az előbbi molekula, melynek kémiai elnevezése trimetil-arzónium-acetát a vele analóg glicinbetain molekuláról  $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-]$  kapta a nevét. Mivel a kutatók a kémiai nevét túlságosan részletesnek találták, sokkal inkább elterjedtte vált az arzenobetain elnevezés és az ebből származtatott rövidítés. A trimetil-arzin-oxid (TMAO) és a tetrametil-arzónium-kation (TETRA) rövidítései teljes körben elfogadottá váltak az arzén-speciációval foglalkozó kutatók körében. Az újabb vegyületek esetében visszatértek a kémiai név alapú rövidítéshez. Ilyen a dimetil-arzinoil-etanol (DMAE), a korábban már említett dimetil-arzinoil-acetát (DMAA) és a trimetil-arzonium-propionát (TMAP). Mivel az utóbbi vegyület az arzenobetaintól csak egy  $-\text{CH}_2-$  csoportban különbözik, számos publikációban mint arzenobetain 2 (AB2) találkozhatunk vele. A kémiai névből eredő rövidítés leíróbb és több információt nyújt a molekula szerkezetéről, ezért a TMAP terjedt el leginkább. A dolgozatban én is ezt használom. Sokkal nagyobb fejtörést okozott a kémikusoknak a bonyolultabb vegyületek elnevezése és rövidítése. Ilyenek például a különböző arzenocukrok, ahol a betűszavak helyett célravezetőbbnek találták a molekulák oldalláncára utaló rövidített elnevezések használatát. Ez nem túl hosszú, mégis információt nyújt a specieszek szerkezetéről.



1. ábra Arzénmódosulatok szerkezeti képletei, nevei és rövidítései

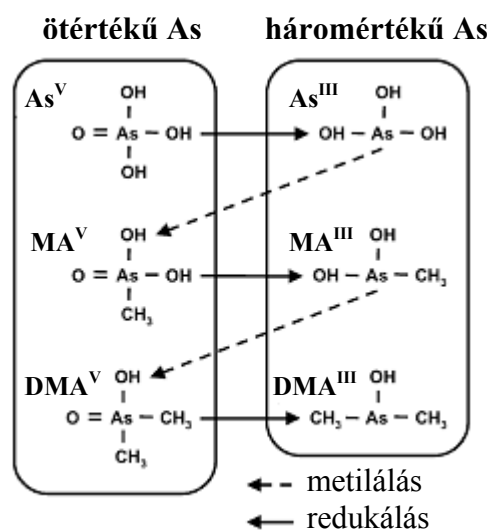
## **2.4 Az arzén biológiai jelentősége**

Az ember folyamatosan ki van téve a vízben és különböző élelmiszerekben található szerves és szervetlen arzénvegyületek által okozott hatásoknak. Az arzénkomponensek eltérő fizikokémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, biológiai hasznosulásuk különböző. Lebontási folyamatuknak feltérképezése az állatokban és az emberekben éppen ezért egy igen összetett feladat. Az arzén főként a tápcsatornán és a légutakon keresztül jut szervezetünkbe. Először a májba és a vesébe kerül, majd az expozíciót követő 24 órán belül az arzén legnagyobb hányada a csontokban, a bőrben és a különböző szaruképletekben halmozódik fel.

Az arzénmérgezés kétféle lehet: akut és krónikus. Az akut mérgezés jelei: hasmenés, hányás, heveny keringési zavarok, fejfájás, bénulás. A halált a nagyfokú folyadékvesztés következtében fellépő anyagcserezavar, kóma okozza. A krónikus arzénmérgezés általános rosszulléttel, gyengeséggel és étvágycsökkenéssel kezdődik. A mérgezés előrehaladtával fájdalmas idegyulladás alakulhat ki, mely később érzéketlenséget, a lábizmok, ritkábban a kézizmok bénulását okozhatja. Sötétszürke pigmentációval járó arzén-melanózis, valamint a tenyéren és a talpon hiperkeratózis alakulhat ki. Végző stádiumban fulladásos roham léphet fel, melyet szellemi leépülés követhet (HINDMARSH, 2000). Az arzén belégzése megnöveli a tüdőrák kialakulásának valószínűségét. A szervetlen arzén felvétele (folyadékkal vagy táplálékkal) fokozza a bőrdaganatok, a húgyhólyag-, a vese-, a máj- és a tüdőrák kialakulásának esélyét.

Az ivóvíz szervetlen arzéntartalma világszerte komoly veszélyforrást jelent a lakosság egészségére. Humán epidemiológiai adatokra alapozva a szervetlen arzénkomponenseket karcinogenitás szempontjából az első csoportba sorolják (IARC, 1987). Állatkísérletek bizonyítják, hogy a szervetlen arzenit és arzenát átjut a placentán (WHO, 2001). Biológiai hasznosulásuk nagymértékben függ a mátrixtól, mellyel a szervezetbe kerülnek, valamint a béltraktusban jelen lévő egyéb élelmiszerösszetevőktől. A szervetlen arzénvegyületeket a szervezet metilezéssel méregteleníti, majd metil-arzonát ( $MA^V$ ) és dimetil-arzinát ( $DMA^V$ ) formájában a vizelettel választja ki (VAHTER, 1999). A méregtelenítés főként a májban megy végbe, ahol a folyamatot egy metil-transzferáz enzim katalizálja S-adenozil-metionin (SAM) és glutation (GSH) segítségével. A vizelet vizsgálatát széles körben alkalmazzák az arzén kitettség mérésére. Amennyiben a mérgezés mértékéhez képest a vizelet  $MA^V$  és  $DMA^V$  szintje alacsony, - ami a méregtelenítési folyamat alacsony hatásfokának tulajdonítható - a rizikófaktor növekedésével kell számolnunk (VAHTER, 2000). Újabb tanulmányok arról számolnak be, hogy az  $MA^V$  és a  $DMA^V$  a szervezetben háromvegyértékű formákká ( $MA^{III}$  és  $DMA^{III}$ ) redukálódnak és így választódnak ki a vizelettel (LE, 2000a; MANDAL, 2001). Suzuki és munkatársai eddig

összegejtött ismeretanyag alapján részletesen felvázolták az emberi szervezetben lejátszódó arzénmetabolizációs folyamatot, melynek egy egyszerűsített ábráját mutatom be (**2. ábra**) (SUZUKI, 2002).



**2. ábra** Szervetlen arzén feltételezett metabolizációs folyamata

A folyamat redukció és metiláció egymást követő lépéseiből áll. Számos vizsgálat alátámasztja, hogy a metabolizációs folyamat során keletkezett háromvegyértékű szerves arzénszármazékok nagyságrendekkel toxikusabbak, mint a szervetlen arzénformák (MANDAL, 2002). A legújabb kutatási eredmények alapján tehát nem beszélhetünk egyértelműen méregtelenítési folyamatról. A háromvegyértékű arzénkomponensek gátolhatják a különböző enzimatikus folyamatokat, mint például a glikolízist vagy a trikarboxilsav-ciklust az enzimek szulfhidril csoportjának megkötésével. Az ötvegyértékű arzénvegyületek inaktívalhatják a mitokondriális oxidatív foszforilációt.

A fent említett hat arzénkomponensen kívül az **1. ábrán** bemutatott arzénkomponensek lebontási folyamatairól még hiányosak az ismereteink. Eddigi eredmények szerint ezen komponensek feltehetően nem, vagy csak kisebb mértékben mérgezőek. Néhány vegyület, mint az AB és az AC változatlan formában távoznak a szervezetből (BROWN, 1990), míg az arzenocukrok lebontása során több, mint 12 arzénkomponenst mutattak ki a vizeletből (RAML, 2005).

## 2.5 Az arzén módosulatanalitikájának hajnala

Gyakori előfordulásának köszönhetően számos arzéntartalmú vegyület található a környezetben és a különféle biológiai rendszerekben. Már évtizedekkel ezelőtt felismerték, hogy a teljes arzénkoncentráció ismerete nem nyújt elegendő információt az arzén biológiai és környezeti hatásairól, toxicitása ugyanis nagymértékben függ oxidációs állapotától és kötődési formájától. Már a század elején körvonalazódott az arzénspeciációs vizsgálatok iránti igény, amikor a tudósok nagy mennyiségben mutattak ki arzént tengeri eredetű élelmiszerekből (FRANCESCONI, 1993). Már akkor felmerült a kutatókban, hogy egy, az emberi szervezetre ártalmatlan, szerves kötésű arzénvegyületről lehet szó, de megfelelő analitikai háttér hiányában ez a feltevés bizonyítatlan maradt. A vizelet arzéntartalma jó indikátornak bizonyult az arzén expozíció vizsgálatára. Chapman és munkatársai 1926-ban kimutatták, hogy homár és különböző tengeri kagylók fogyasztását követően a vizelet arzéntartalma jelentősen megnő (CHAPMAN, 1926). Az első igazi áttörést az arzénspeciációban 1973-ban Braman és Foreback munkája jelentette, akik elsőként azonosítottak arzénkomponenseket vizeletben (BRAMAN, 1973). Az arzén hidridképző tulajdonságát kihasználva, arzén-hidridet képezve választották el a szervetlen arzenitet és arzenátot, valamint az egyszer ( $\text{MA}^{\text{III,V}}$ ) és kétszer ( $\text{DMA}^{\text{III,V}}$ ) metilezett arzén formákat. A módszer alapja egy szelektív hidridképzési folyamat, mely során a különböző arzénkomponensek nátrium-tetrahidroborát hatására savas közegben arzén-hidrideket képeznek. Az arzenit és arzenát redukciójának eredményeként arzin ( $\text{AsH}_3$ ), míg az MA és a DMA redukciója során metilarzin ( $\text{CH}_3\text{AsH}_2$ ) és dimetilarzin ( $((\text{CH}_3)_2\text{AsH})$  keletkezett (a hidridképzésről egy későbbi fejezetben bővebben számolok). A keletkezett arzin vegyületeket kriogén csapdába juttatták. A rendszert szobahőmérsékletre felfűtve a különböző komponenseket forráspontjuk alapján elpárologtatták, az arzént pedig atomemissziós spektrometriás módszerrel detektálták.

A módszerfejlesztést követően a hidridfejlesztéses technika meghatározó szerepet kapott az arzénspeciációs vizsgálatokban. A Braman és Foreback által kifejlesztett módszert a **hidridképzés - elválasztás - detektálás** sorrendje jellemezte. Tovább lépésnek számított a keletkezett gázok gázkromatográfiás elválasztása. Az első módosulatanalitikai módszerek elsősorban tengervíz, egyéb természetes vizek és vizeletminták szervetlen arzenit ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) és arzenát ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) vizsgálatára korlátozódtak. A fő problémát azonban még mindig az jelentette, hogy a módszer nem tette lehetővé a három és az ötvegyértékű arzénkomponensek ( $\text{As}^{\text{III,V}}$ ,  $\text{MA}^{\text{III,V}}$ ,  $\text{DMA}^{\text{III,V}}$ ) szelektív elválasztását, mivel a derivatizálást követően mindkét komponensből háromvegyértékű arzin keletkezett. Továbbá a fent említett arzénmódosulatokon kívül más arzénkomponenseket tartalmazó minták elemzésére sem volt lehetőség, ugyanis az adott

körülmények között csak ezen vegyületek rendelkeztek hidridképző tulajdonsággal. Azért hangsúlyozom az „adott körülmények” kifejezést, mert a későbbiekben látni fogjuk, hogy bizonyos paraméterek változtatásával és új paraméterek bevezetésével a különböző arzénkomponensek hidridképzési hatásfoka javítható, illetve a komponensek hidridaktívvá alakíthatók.

Kimutatták, hogy magasabb pH-n ( $\text{pH} > 6$ ) kizárólag a háromértékű arzénkomponensek képesek arzén-hidrid kialakítására, így azokat szelektíven meg lehet határozni (DEL RAZO, 2001). Továbbá, ha megváltoztatjuk a hidridképzési folyamat sorrendjét, akkor a következő szekvenciát kapjuk: **elválasztás - hidridképzés - detektálás**. Ezek a változtatások már elégségesek voltak ahhoz, hogy újabb lehetőségek nyíljanak az arzénspeciáció terén. Az arzénkomponensek elválasztására kezdetben szelektív gyantákat használtak (FODOR, 1983). A nyolcvanas évek végére sorra jelentek meg azok a közlemények, amelyek különféle nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) technikákat - méretkizárásos (FRANCESCONI, 1985), fordított fázisú (MATSUTO, 1986) és ioncserés (SHIOMI, 1987) kromatográfiát - alkalmaztak az arzénkomponensek elválasztására. Mivel a komponensek elválasztása a hidridfejlesztési lépést megelőzően történt, azok időben elkülönítve kerültek be a hidridképző egységbe, lehetővé téve az egyes arzénmódosulatok külön-külön történő mennyiségi meghatározását.

A bevezetőben már említésre került, hogy az 1980-as években előszeretettel alkalmazták a láng-atomabszorpciós spektrométereket. Ez a detektálási mód azonban nagy háttérzaja és alacsony érzékenysége miatt nem ígérkezett hosszú életűnek az arzénspeciációban. Voltak ugyan kísérletek arra, hogy HPLC elválasztást csatoltak grafitkemencés atomabszorpciós spektrométerhez (GFAAS), de a műszerkapcsolás nehézsége miatt az off-line úton legyűjtött frakciókat külön-külön kellett megvizsgálni (STOCKTON, 1979). Az ICP technikák elterjedésével egyre nagyobb tért hódítottak a HPLC-ICPAES kapcsolt analitikai rendszerek. A kapcsolat nagy előnye, hogy a HPLC efluens ml/perc-es áramlási sebessége jól összeegyeztethető volt az ICPAES számára optimális áramlási sebességgel. Számos kiváló HPLC-ICPAES mérésen alapuló publikáció született a témában, azonban alkalmazási területének határt szabott a módszer oldatra vonatkoztatott 50 ng/ml-es kimutatási határa. Azóta az ICPAES technikák is sokat fejlődtek, kimutatási határuk mára már egy nagyságrenddel csökkent, mely hidridképzéses lépés közbeiktatásával tovább javítható.



## **2.6 A korszerű arzénmódosulat-analitika**

Az 1990-es években a technika rohamos fejlődésével párhuzamosan a korszerű műszereknek köszönhetően az arzénmódosulat-analitikai módszerek fejlődése is nagy lendületet vett. A természetben és a különféle biológiai rendszerekben sokszor csupán nyomokban jelenlevő arzénkomponensek kimutatása is lehetségessé vált a korszerűbb műszerekkel és csatolt technikákkal. Amikor módosulatanalitikai módszerről beszélünk, értelemszerűen beleértjük a mintaelőkészítést, a különböző módosulatok szelektív elválasztását és a detektálást. Ezek alapján a módszerünkkel szemben támasztott, alábbi általános követelményeket fogalmazhatjuk meg.

Egyrésről a mintaelőkészítés során olyan eljárást kell alkalmazni, amellyel a vizsgálandó módosulatok a lehető legnagyobb mennyiségben kinyerhetők anélkül, hogy azok eredeti eloszlása megváltozna. Kivételt képeznek azok a célirányos kísérletek, melyek célja valamilyen kinyerési, illetve hasznosulási modell felállítása (pl.: az emésztés során hasznosuló specieszek felszívódásának modellezése).

Az elválasztás során törekedni kell továbbá a lehető legjobb kromatográfiás felbontás elérésére, hogy a mintában lévő módosulatok szelektíven egymás mellett meghatározhatók legyenek. Az elválasztáshoz alkalmazott mozgófázis sebessége és összetétele összeférhető legyen az alkalmazott detektálási módszerrel.

Végül a detektorral szemben támasztott legfontosabb követelmény annak érzékenysége és kimutatási határa az adott komponensre. Azonban az egyéb paraméterek sem elhanyagolhatók, mint például a szelektivitás vagy a linearitás.

A módosulatanalitikai módszerek kimutatási határa nem csak az alkalmazott detektálási módtól, hanem az elválasztástól is nagymértékben függ. Nem elhanyagolható, hogy a mérendő komponens milyen retenciós időnél és milyen félértékszélességgel eluálódik az adott kromatográfiás oszlopról, továbbá az elválasztáshoz alkalmazott mozgófázis milyen hatással van a komponens jelképzésére a detektorban.

### **2.6.1 Mintavétel, mintaelőkészítés az arzénspeciációban**

#### **2.6.1.1 Mintavétel**

Egy analitikai vizsgálat során az első lépés a mintavétel, melyet körütekintően mindig a vizsgálandó mintára specifikusan kell megtervezni. Az eredményeket számos tényező befolyásolja, amiket már a mintavétel során figyelembe kell venni. Ide sorolható a földrajzi

elhelyezkedés, a szezonáltság, biológiai minták esetében a populáció és annak közvetlen környezete. A tárolóedény megválasztásánál mérlegelni kell, hogy az milyen anyagból legyen. A helytelen választás esetén ugyanis fennáll a veszélye, hogy a vizsgálandó specieszek adszorbeálódnak az edény falán. Általában salétromsavat használnak a tárolók előzetes tisztítására és öblítésére, azonban a visszamaradó sav oxidálhatja a különböző arzénmódosulatokat a mintában.

### 2.6.1.2 Arzén vegyületek stabilitása

A módosulatanalitikai vizsgálatok mérési eredményeinek a minta eredeti (mintavétel pillanatában fennálló) állapotát kell reprezentálniuk. Arra kell törekedni, hogy a mintánkat ne tegyük ki olyan hatásoknak, amelyek veszélyeztetnék a különböző módosulatok eredeti eloszlását és koncentrációját. Biológiai minták esetén a lehetséges mikrobiológiai aktivitás elkerülése érdekében a mintákat alacsony hőmérsékleten kell tárolni. Ezzel elkerülhető a minták természetének és összetételének megváltozása. A hűtés azonban nem minden esetben elegendő az arzénkomponensek stabilitásának fenntartására. Le és munkatársai ugyanis kimutatták, hogy a 4 °C-on tárolt mintaoldatokban az AB kilenc hónap alatt TMAO-ra és két további komponensre bomlott (LE, 1994). A tartósítás további lehetséges módja - ha azt a minta jellege lehetővé teszi - a fagyasztva szárítás, amely egyben a minta koncentrációját is jelenti. Stabilitási problémák leginkább a szerves arzénkomponensek esetében léphetnek fel. Jelentős arzenit- és arzenáttartalmú víz- és vizeletmintákat gyakran salétromsavval kezelik (SUTTON, 2000). Ez az eljárás azonban csak teljes arzenáttartalom meghatározása esetén alkalmazható. Ellenkező esetben a fellépő oxidáció következtében a három- és ötvegyértékű módosulatok eredeti aránya megváltozhat. Korábbi publikációk az ivóvízminták  $\text{As}^{\text{V}}$  dominanciájáról számolnak be, míg napjainkban egyre több olyan tanulmány születik, amelyek egyértelműen bizonyítják, hogy a vízminták fő arzénkomponense az  $\text{As}^{\text{III}}$ . A különbség valószínűleg a helytelen mintakezelésből ered (KIM, 2001; ROIG-NAVARRO, 2001). Megoldást jelenthet a nem oxidáló savak alkalmazása. A sósav megfelelő lehet erre a célra, de csak abban az esetben, ha a speciációs vizsgálatot nem ICPMS készülékkel végezzük, ugyanis a nagy kloridiontartalom interferenciát okozhat (az  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$  zavarásról a detektorok fejezetben bővebben beszámolok).

Kedvezőnek bizonyultak az olyan módszerek, melyek során a mintában található  $\text{As}^{\text{III}}$  és  $\text{As}^{\text{V}}$  elválasztása már a mintavétel helyén megtörténik. A módszer hordozhatósága lehetővé teszi a szerves arzénkomponensek azonnali elválasztását, így nincs szükség a minta tartósítására. Az eljárás alapja egy szilárd fázisú extrakció, mely során egyszer használatos, szilikagél alapú, erős anioncserélő gyantát tartalmazó oszlopokat alkalmaznak. A gyanta az  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot megköti, míg az

As<sup>III</sup> visszatartás nélkül halad át az oszlopon. Az arzénát ezt követően különböző oldószerekkel szelektíven lemosható a gyantáról (KIM, 2001; LE, 2000b).

Stabilitási problémát okozhat még a minta nagy vastartalma (Fe<sup>III</sup>). A magas vastartalmú ivóvizekben az amúgy vízdoldható arzén könnyedén oldhatatlan csapadékot képezhet, ami mérési adatok pontatlanságát eredményezheti. Gallagher és társai kimutatták, hogy a nem kívánatos csapadékképződés az EDTA-nak mintába történő adagolásával elkerülhető, illetve mérsékelhető (GALLAGHER, 2001). A stabilitás nemcsak mátrix, hanem koncentrációfüggő is. Tanszékünkön folytatott korábbi kísérletek eredményei is igazolják, hogy a 4 °C-on tárolt 0.5 és 1 µg/ml koncentrációjú arzenit és arzenát oldat egyéb kezelés nélkül 21 napig megőrizte stabilitását (JOKAI, 1998). Általánosságban elmondható, hogy a szerves arzénkomponensekre a szervetlen módosulatoknál sokkal nagyobb stabilitás jellemző. Palacios és munkatársai kimutatták, hogy 4 °C-os tárolási hőmérsékleten a vizeletminta MA<sup>V</sup>, DMA<sup>V</sup> és AB összetevői legalább 67 napig megőrizték stabilitásukat (PALACIOS, 1997). Hasonló tanulmányokat végeztek vizeletmintákon As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, MA<sup>V</sup>, DMA<sup>V</sup> és AB esetében, ahol a tárolás hőmérsékletének, idejének és a mintához adott különböző reagenseknek az arzénkomponensek stabilitására gyakorolt hatását vizsgálták. Az eredmények azt mutatták, hogy a minták -20 és 4 °C-on 2 hónapig tárolhatók anélkül, hogy az arzénmódosulatok eredeti eloszlása megváltozna. A hosszabb tárolási idő esetén a különböző specieszek stabilitása nagymértékben függött a mátrixtól (FELDMANN, 1999).

A vizeletben található arzénmetabolitok vizsgálata ismét a kutatók érdeklődésének középpontjába került, miután az emberi vizelet fő arzénkomponenseként azonosították a szerves arzénkomponensek biotranszformációjának köztes termékeként keletkező és feltehetően mérgező MA<sup>III</sup>-t és DMA<sup>III</sup>-t. Hasonlóan az ötvegyértékű komponensekhez, stabilitásuk nagymértékben függ a mintamátrixtól (DEL RAZO, 2001). Kutatási eredmények támasztják alá, hogy ioncserélt vízben oldva, 4 °C-os tárolási hőmérsékleten a MA<sup>III</sup> akár 4 hónapig, míg a DMA<sup>III</sup> legfeljebb 10 napig őrizte meg stabilitását. Ugyanezen hőmérsékleten a vizeletben található MA<sup>III</sup> három nap alatt, míg a DMA<sup>III</sup> mindösszesen 90 perc alatt ötvegyértékű formává oxidálódott (GONG, 2001).

### 2.6.1.3 Mintaelőkészítés teljes arzéntartalom meghatározásához

A mintaelőkészítés során mindig arra kell törekednünk, hogy a mintát a mérőrendszerbe juttatható állapotba hozzuk. A legáltalánosabban elterjedt mintabeviteli technikák porlasztáson alapulnak, amihez a vizsgálandó mintát folyadék halmazállapotúvá kell alakítani. A módosulatanalitikai vizsgálatok esetén a teljes arzéntartalom meghatározásának célja kettős: (i)

egyrészt meghatározzuk a különböző arzénkomponensek együttes koncentrációját a teljes mintában, (ii) illetve extrakciót követően külön a felülúszóban és külön a visszamaradt üledékben. Ezt követően az így kapott eredményekből kiszámíthatjuk az extrakciós hatásfokokat, valamint felállíthatjuk a teljes anyagmérleget. A teljes arzéntartalom meghatározás során a mintát teljes egészében feltárjuk. A minta szervesanyag tartalmának tökéletes elroncsolása a cél. A roncsolás során a mintát általában oxidatív savas (salétromsavas) kezelésnek vetik alá, melyet gyakran hidrogén-peroxiddal kombinálnak. A hidrogén-peroxid alkalmazása egyfajta „oxidatív sokk” révén ugyancsak a tökéletes roncsolást segíti elő. Alkalmazása nem mintafüggő és a szakirodalom alapján nem lehet egyértelmű okot találni használatára illetve mellőzésére. Minél többszörösen metilezett, minél több arzén-szén kötést tartalmaz az adott arzénmódosulat, annál jobban ellenáll a feltárásnak. Ezzel a problémakörrel abban az esetben kell kiemelten foglalkoznunk, ha a teljes arzéntartalom meghatározás alapját a hidridképzéses technika képezi. A különböző arzénmódosulatok eltérő hidridképzési hatásfoka miatt arra kell törekednünk, hogy az összes komponenst azonos formába hozzuk. Ezért a hagyományos, 100-120 °C-on végzett teflonbombás feltárás csak abban az esetben alkalmazható (pl.: vizelet minták esetén), ha a mintánk nem tartalmaz többszörösen metilezett arzénszármazékokat. A különböző környezeti minták, főként a tengeri eredetű szervezetek teljes feltárása a nagy AB tartalom miatt az említett módszerrel nem végezhető el, ugyanis az AB bomlása csak erőteljesebb körülmények között (300 °C-on, 90 percen keresztül) megy végbe (GOESSLER, 2003). Mára már egyre inkább elterjedté váltak az úgynevezett fókuszált mikrohullámmal működő roncsoló berendezések, ahol magas hőmérsékleten (250-300 °C) és megnövelt nyomáson (akár 100 bar) a mintában található arzénkomponensek 1 óra alatt kivétel nélkül arzenáttá oxidálhatóak. A módszer előnye, hogy az említett paraméterek nagyon jól kézben tarthatóak, hátrány azonban a berendezés magas beruházási költsége.

#### **2.6.1.4 Mintaelőkészítés az arzénmódosulatok meghatározására**

A teljes arzén meghatározásnál végzett mintaelőkészítéssel ellentétben, a vizsgált minta arzénmódosulatainak meghatározásánál a minta eredeti speciesz eloszlásának megőrzése az elsődleges szempont. Az utóbbi évtizedben az extrakciós módszerek kidolgozása során a kutatók a lehető legnagyobb kinyerési hatásfok elérésére törekedtek az extrakcióhoz szükséges idő és oldószer felhasználás csökkentése mellett. A módosulatanalitikai vizsgálatok tárgyát legtöbbször szilárd minták képezik, melyek esetében az arzén vegyületek kinyerése gyakran bonyolult feladat. Ezért sok esetben szükség van az extrakció optimálására. A nagy zsírtartalmú minták esetén előzetes zsírtalanítási lépésre van szükség, melyet általában éterrel vagy acetonnal

végeznek el (MCKIERNAN, 1999). Az arzénmódosulatok legnagyobb hányada a mintában vízzel oldható formában van jelen, melyek az esetek többségében ioncserélt vízzel kinyerhetők. A vizes extrakció mellett az arzénspeciációban széles körben elterjedt a metanol-víz különböző arányú elegyének extraháló szerként való alkalmazása, mely Shibata és Morita egy korai munkájára vezethető vissza. Ebben a tanulmányban a szerzők több meggyőző érvet sorakoztattak fel a keverék alkalmazása mellett (SHIBATA, 1989). Metanol alkalmazása esetén sokkal kevesebb mátrix oldódik ki a mintából, továbbá a kinyerést követően a metanol könnyebben távolítható el, elősegítve ezzel a minta koncentrációját. Ezek a paraméterek főként akkor váltak fontossá, mikor több kilogramm anyagot kellett feldolgozni a különböző arzénvegyületek izolálása és standard vegyületek előállítása céljából (EDMONDS, 1993). Az előbb említett előnyök ellenére mégis éppen Edmonds és munkatársai voltak azok, akik kevésbé hatékony extraháló szerként említették a metanolt (EDMONDS, 1994). Általános tévedés, hogy a szerves arzénkomponensek oldhatósága metanolban jobb, mint vízben csak azért, mert szerves kötéseket is tartalmaznak. Az arzenolipidek kivételével ugyanis a természetben előforduló és máig azonosított arzénvegyületek vízben jól oldódnak. Az arzenolipidek meghatározása során a metanol elpárologtatása és a minta vízben való visszaoldása a nem poláros arzénkomponensek elvesztésével jár. A korábbi arzénspeciációs tanulmányok a tengeri eredetű mintákra fókuszáltak, melyek arzéntartalmának jelentős részét vízben és metanolban egyaránt jól oldódó arzenobetain tette ki. Ennek köszönhetően legtöbbször 90%-nál nagyobb kinyerési hatásfokokról számoltak be a kutatók. A tengeri algák vizsgálata során azonban az eddig alkalmazott kinyerési technikák mellett legtöbbször valamivel alacsonyabb kinyerési hatásfokokat (80%) sikerült elérni. Ez az általános megfigyelés vezetett ahhoz, hogy a kutatók különböző paramétereket változtatva törekedtek a lehető legmagasabb kihozatal elérésére. Több kutató egy olyan extrakciós módszer kidolgozását tűzte ki célul, mellyel minden egyes arzénkomponens, bármilyen eredetű mintából kinyerhetővé válik. Tukai és munkatársai négy paramétert változtatva három tengeri alga faj esetében vizsgálták az extrakciós hatásfokot (TUKAI, 2002). Azt találták, hogy az extrahálószer optimális metanol koncentrációja 50% és 80% között váltakozik a vizsgált minta függvényében. A kinyert arzén mennyiségét a hőmérséklet és az extrakció ideje nem befolyásolta. Az eredmények rávilágítottak az extrakció optimalizálásának fontosságára. Látható, hogy a kinyerés hatékonysága és az extrakciós paraméterek optimuma nem csak, hogy mintatípus függőek, de még az azonos eredetű minták esetében is tapasztalhatók eltérések.

A 90-es években az addig főként tengeri eredetű mintákra korlátozódó arzénspeciációs vizsgálatokat egyre inkább kiterjesztették szárazföldi mintákra is. A kutatók rögtön felismerték, hogy a metanol-víz különböző elegyének alkalmazásán alapuló kinyerési módszerek nem bizonyultak olyan hatékonyak, mint a tengeri minták esetében. Metanol-víz elegyét alkalmazták

például rizsminták arzénmódosulatainak kinyerésére, mely során a teljes arzéntartalomnak mindössze 18%-át sikerült kinyerni a mintából (ABEDIN, 2002). További tanulmányok is hasonló kinyerési hatásfokokról számolnak be metanol-víz alkalmazása során különböző szárazföldi növények esetében (GEISZINGER, 2002a; KOCH, 1999). Arzénkomponensek kinyerésének javítására Heitkemper és munkatársai trifluor-ecetsavat alkalmaztak, mellyel 90%-nál nagyobb extrakciós hatásfokot értek el (HEITKEMPER, 2001). Hasonló megállapításra jutottak Bohari és munkatársai, akik foszforsav oldat alkalmazásával növelték meg a kinyerhető arzénmódosulatok mennyiségét (BOHARI, 2002).

Természetesen az oldószer hatása mellett az extrakciós eljárás megválasztása is nagymértékben hozzájárul az arzénkomponensek sikeres kinyeréséhez. Az általánosságban használt rázatásos módszereket - melyek gyakran 10-14 órás kezelést jelentenek - egyre inkább felváltják a korszerűbb, kevésbé időigényes eljárások. Ilyenek például az ultrahangon (SANZ, 2005a; SANZ, 2005b) és a mikrohullámon (ACKLEY, 1999; CHATTERJEE, 2000) alapuló mintaelőkészítési módszerek. Gomez-Ariza és munkatársai egy átfogó tanulmányt készítettek a különféle kinyerési módszerek összehasonlításáról, mely során a Soxhlet extrakciót állították szembe az ultrahangos és mikrohullámú extrakcióval. Minden esetben az alkalmazott oldószer metanol, illetve metanol-víz 1:1 arányú elegye volt (GOMEZ-ARIZA, 2000). A szerzők kimutatták, hogy az extrakciós paraméterek nagymértékben mintafüggők. A legtöbb minta esetében a mikrohullámú extrakció hatásfoka elmarad az ultrahangos és Soxhlet extrakció hatásfoka mögött. Az utóbbi két technika hatékonysága közel azonos, a kinyerés oldószer- és időszükséglete miatt azonban az ultrahangos módszer bizonyult kedvezőbbnek.

Az arzénspeciációban alkalmazott kinyerési módszerek sokfélesége is jelzi, hogy a megfelelő mintaelőkészítési eljárás kidolgozása a módosulatanalitikai vizsgálatoknak egy igen összetett és bonyolult részfeladatát képezi. A megfelelő analitikai háttér segítségével a kinyert komponensek meghatározása ugyan jól kézben tartható, azonban számos megválaszolatlan kérdés merül fel a nem kinyerhető arzénkomponensekkel kapcsolatban. Eddig ismeretlen arzénkomponensekről van e szó? Milyen kötésben vannak jelen a mintában? Milyen toxicitás jellemzi őket? Másrésről az arzénspeciációval foglalkozó kutatóknak mérlegelniük kell, hogy valóban a kinyerés maximálása-e az az irányvonal, melyet feltétlenül követniük kell, vagy esetleg olyan kinyerési technikák kidolgozására kell törekedniük, ami az arzéntartalmú táplálékok elfogyasztása során a szervezet arzénfelvevő képességét hivatott modellezni. Az eddigi kutatások alátámasztják, hogy nem használható egységes kinyerési módszer a különböző minták esetében. A cél tehát olyan extrakciós technikák kidolgozása, melyek kiválóan alkalmazhatók jól definiálható mintatípusok, illetve meghatározott céllal rendelkező módosulatanalitikai feladatok (pl.: a különböző arzénkomponensek felszívódásának modellezése az emberi szervezetben) esetén.

## 2.6.2 Az arzénspeciációban alkalmazott elválasztástechnikai módszerek

A különböző vegyületek folyadékkromatográfiás elválasztása azok fizikokémiai tulajdonságain alapul. Ilyen tulajdonságok a molekula sav-bázis jellege ( $pK_a$ ), polaritása, és oldhatósága. Vannak olyan arzénvegyületek, melyek egy ( $DMA^V$ ,  $TMAO$ ), kettő ( $MA^V$ ), vagy három ( $As^{III}$ ,  $As^V$ )  $pK_a$  értékkel rendelkeznek. A kettő vagy három disszociációs állandóval rendelkező vegyület kettő, illetve három protont képesek leadni többlépcsős disszociációval. Az  $AB$  szintén képes proton leadására. Mivel protonált állapotban az  $AB$  pozitív töltésű, a karboxilcsoport deprotonálódását követően a molekula ikerionos szerkezetűvé válik. Az  $AC$  és  $TETRA$  ionizációja független az alkalmazott eluens pH-jától, ezek a vegyületek minden esetben egyszeres pozitív töltéssel rendelkező kationok.

A legáltalánosabban elterjedt elválasztástechnikai módszer az arzén módosulatanalitikában a nagyhatékonyságú-folyadékkromatográfia (HPLC), emellett alkalmaznak még gázkromatográfiát (GC), szuperkritikus folyadékkromatográfiát (SFC), valamint kapilláris elektroforézist (CE). Tekintettel az arzénvegyületek ionos karakterére a leggyakrabban használt HPLC-s módszerek a fordított fázisú ionpárpépző és az ioncserés kromatográfia.

**1. táblázat** A vizsgált arzénmódosulatok  $pK_a$  értékei (SUNER, 2001)

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>As<sup>III</sup></b> (pK <sub>a</sub> =9.2/13.5/14)	H <sub>3</sub> AsO <sub>3</sub>									H <sub>2</sub> AsO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			
<b>As<sup>V</sup></b> (pK <sub>a</sub> =2.3/6.7/11.6)	H <sub>3</sub> AsO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> AsO <sub>4</sub> <sup>-</sup>					HAsO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>				AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>		
<b>MA<sup>V</sup></b> (pK <sub>a</sub> = 3.6/8.2)	CH <sub>3</sub> AsO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>		CH <sub>3</sub> AsO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>					CH <sub>3</sub> AsO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>					
<b>DMA<sup>V</sup></b> (pK <sub>a</sub> = 6.3)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO <sub>2</sub> H						(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> AsO <sub>2</sub> <sup>-</sup>						
<b>AB</b> (pK <sub>a</sub> = 2.2)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> C		(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>										
	H <sub>2</sub> COOH												
<b>TMAO</b> (pK <sub>a</sub> = 3.6)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> OH			(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> AsO									
<b>AC</b> (pK <sub>a</sub> = nines)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH												
<b>TETRA</b> (pK <sub>a</sub> = nines)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> As <sup>+</sup>												

### 2.6.2.1 Ioncserés kromatográfia

Az ioncserés kromatográfiát ionok és könnyen ionizálható vegyületek elválasztására használják, mely során az egyensúly a mozgó fázis ionjai és a töltet ellentétes ionjai között

alakul ki. Az ioncserés kromatográfiát alapjában véve kétféle módon alkalmazzuk. Az álló fázis felületének töltése alapján léteznek anion- és kationcserélő oszlopok. Az állófázis lehet módosított szilikagél alapú, vagy szerves polimer alapú, melyek között az alapvető különbség az alkalmazhatóságukban rejlik. A **módosított szilikagélek** porózusak, az ioncserélő csoportokat a szilikagél módosításával alakítják ki. Ezek a töltetek csak pH=2-7 közötti tartományban alkalmazhatók, azonban jellemző rájuk a nagy nyomásállóság (300-400 bar) és, hogy bármely szerves oldószerrel használhatóak. A **polimer alapú álló fázisok** nagy előnye, hogy a teljes pH tartományban használhatóak, azonban nyomásállóságuk elmarad a szilikagélekéhez képest (~250 bar). Általában egyszerűségük miatt az izokratikus kromatográfiás vizsgálatok az elválasztástechnikai módszerek döntő többségét képviselik. A gradiens elúcióval azonban sokszor nagyobb elméleti tányérszámot és jobb felbontást érhetünk el, mindemellett csökkenthető a komponensek retenciós ideje is. Hátrányuk, hogy a módszer kifejlesztése összetettebb és sokszor a komponensek retenciójának csökkentésével nyert idő az oszlop regenerálására fordítódik.

Az ioncserés kromatográfiában az elválasztást elsősorban az alábbi paraméterek befolyásolják:

- a mozgófázis ionerőssége
- a mozgófázis pH-ja
- a puffer anyagi minősége és koncentrációja
- szerves oldószer tartalom
- hőmérséklet

Az arzénkomponensek eltérő kémiai tulajdonságai nem teszik lehetővé, hogy egy kromatográfiás módszerrel minden egyes komponenst meghatározhassunk. Anioncserét alkalmaznak általában az  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{DMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{MA}^{\text{V}}$  és  $\text{As}^{\text{V}}$  vizsgálatához, míg az AB, TMAO, AC és TETRA elválasztását kationcserélő oszlopokon végzik (LARSEN, 1998b). A legáltalánosabban alkalmazott mozgófázisok a különböző foszfát (CARUSO, 2001), karbonát (B'HYMER, 2002), tetrametil-ammonium-hidroxid (LINTSCHINGER, 1998) pufferek. Az elválasztás általában 5-15 perc alatt valósítható meg mindkét ioncserélő oszlopon.

A kutatók előszeretettel használnak polimer alapú erős anioncserélő oszlopot, melynek töltete szélsőséges pH tartományban (pH 1-14) is igen stabil. Az anioncserés elválasztások során a legnagyobb kihívást az arzenit visszatartása jelentette. Az  $\text{As}^{\text{III}}$  9.2-es pKa értéke miatt semleges pH tartományban protonált állapotban van jelen, így nincs visszatartása az oszlopon. Ez két szempontból is hátráltatja a kromatográfiás vizsgálatokat: (i) a mintamátrix valamint (ii) a minta esetleges arzenobetain és egyéb kationos arzénkomponensei szintén a holtterfoggattal eluálódnak,



nehezítve az  $\text{As}^{\text{III}}$  mérését. Ackley és munkatársai magasabb pH-n (pH=9) 30 mM-os ammónium-karbonát puffer alkalmazásával tették lehetővé az  $\text{As}^{\text{III}}$  és az AB elválasztását. Az anionos komponensek elválasztásával együtt a mérés azonban 20 percig tartott (ACKLEY, 1999).

Alternatív megoldásként az arzenitet arzenáttá oxidálták, így szüntette meg az  $\text{As}^{\text{III}}$  - AB interferenciát (WEI, 2000). A módszer hátránya, hogy az arzenit meghatározásához a mintát kétszer kellett megmérni. Először oxidálatlan állapotban a tényleges  $\text{As}^{\text{V}}$  tartalmat, majd a mintát oxidálva az  $\text{As}^{\text{III}} + \text{As}^{\text{V}}$  együttes koncentrációját határozták meg. Az  $\text{As}^{\text{III}}$  mennyiségét a kettő különbsége adta. Zheng és munkatársai egy igen elegáns megoldást alkalmazva az arzenitből anionos komplexet képezve 6 arzénkomponenst tudtak elválasztani egymástól anioncserélő oszlopon a következő sorrendben: AC, AB,  $\text{DMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{MA}^{\text{V}}$ ,  $\text{As}^{\text{III}}$  és  $\text{As}^{\text{V}}$  (ZHENG, 1998). B'Hymer és Caruso ammónium-karbonát (pH=8.5) puffer koncentrációját 12.5 mM és 50 mM közötti tartományban változtatva gradiens elúció segítségével 30 perc alatt választották el az előbbi hat arzénkomponenst (B'HYMER, 2002). A fent említett arzénkomponensek esetén jól bevált erős anioncserés kromatográfias oszlopokat különböző arzenocukrok (oxo-glicerol, oxo-foszfát, oxo-szulfát és oxo-szulfonát) elválasztására is alkalmazták. Sanchez-Rodas és kutatócsapata 10 mM-os  $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -ot (pH=5.8) használva 30 perc alatt (SANCHEZ-RODAS, 2002), míg Tukai és munkatársainak 20mM-os  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ -tal (pH=9.2) (TUKAI, 2002), valamint Van Hulle és társainak pedig 20 mM-os  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -tal (pH=7) 15 perc alatt választotta el a négy arzenocukrot egymástól (VAN HULLE, 2002). Mivel az oxo-arzenocukor-glicerol a holtterfogattal eluálódik, fennáll a veszélye, hogy a mintában található és szintén a fronttal eluálódó kationos arzénkomponensek zavarják a meghatározást. Ezért az oxo-glicerol meghatározása az AB, AC, TMAP, TMAO és TETRA komponensekkel együtt erős kationcserélő oszlopon történik. Kationcserélő oszlopként szilikagél és polimer alapú kolonnákat egyaránt alkalmaznak. A legáltalánosabban alkalmazott mozgófázis a pH=2.5 körüli 10-20 mM piridin, mellyel az említett komponensek 10-15 perc alatt elválaszthatóak egymástól (SLEJKOVEC, 1999; TUKAI, 2002). Mivel a komponensek egy része permanens kation, azaz a pH nem befolyásolja az ionizáltságukat, a komponensek retenciója szükség esetén szerves oldószer hozzáadásával csökkenthető. Figyelni kell azonban arra, hogy az eluens 20-30%-nál nagyobb szerves oldószer tartalma duzzasztja az állófázist, annak mechanikai romlását okozva csökkenti nyomásállóságát (FEKETE, 2003).

A fenti példák alapján látható, hogy mind erős anion- mind erős kationcserélő oszlopokon lehetséges az arzénkomponensek 10 percen belüli elválasztása. Azonban a környezetben leggyakrabban előforduló arzénmódosulatok meghatározásához a két módszer együttes alkalmazása szükséges. Több kutatócsoport kísérletet tett olyan elválasztástechnikai módszer

kidolgozására, mellyel az anionos és a kationos arzénvegyületek egy kromatográfiás futtatással elválaszthatók egymástól. Kohlmeier és munkatársai anioncserés kromatográfiát alkalmaztak. A mozgófázis kétszeresen töltött ionpárképző reagenst (0.05 mM benzol 1,2-diszulfonát) tartalmazó salétromsav (pH=3.4) volt. A módszer lehetővé tette az anionos komponensek mellett a benzol 1,2-diszulfonáttal negatív töltésű ionpárt képző kationos komponensek visszatartását is (KOHLMAYER, 2002). Egy hónappal később Sloth és munkatársai egy olyan módszert publikáltak, mellyel 25 perc alatt 23 arzénkomponenst választottak szét (SLOTH, 2003). Ellentétben Kohlmeierrel, Sloth és munkatársai nagy mátrixhatást tapasztaltak, amely a különböző arzénkomponensek retenciós idejének elcsúszásában nyilvánult meg. Ugyanazon minta ismételt vizsgálata esetén a retenciós idő stabilnak bizonyult ( $RSD < 0.5\%$   $n=8$ ), azonban eltérő mátrixú minták vizsgálata során a komponensek elúciós sorrendjében eltérés mutatkozott. Sakai és kollégái szintén az anionos és kationos arzénkomponensek egyszerre történő meghatározására dolgoztak ki egy elválasztástechnikai módszert. A módszer alapja, hogy egy anion és egy kationcserélő oszlopot kötöttek egymás után, majd 4 mM-os foszfát puffert (pH=2.6) alkalmazva 8 arzénkomponenst választottak el egymástól. A felbontás nagyon jónak bizonyult, azonban a módszer rutinszerű alkalmazásának gátat szabott a hosszú, 40 perces futtatási idő (SAKAI, 2001). Az utóbbi 2-3 évben kitüntetett szerepet kaptak az úgynevezett tio-arzenocukrok. Ezen vegyületek esetében az arzénhez kettős kötéssel kapcsolódó oxigén helyett egy kénatom található. Az általánosan elterjedt kromatográfiás módszerek esetében a tio-arzenocukrok elúcióját a hosszú retenciós idő és a megnövekedett csúcshélesség jellemezte. A kéntartalmú arzenocukroknak különös retenciós viselkedését Hansen és munkatársai publikálták először, akik anioncserés kromatográfiával (pH=5.3) 20 perces retenciónál tio-dimetil-arzinoil-acetátot  $[(CH_3)_2As(S)CH_2COO^-]$  mutattak ki bányák vizeletéből (HANSEN, 2004). Soeroes és munkatársai anioncserés kromatográfiát és 20 mM  $NH_4HCO_3$  puffert (pH=10.3) használtak dunai kagylókban található tio-arzenocukor-glicerol és tio-arzenocukor-foszfát elválasztásához, mely során a komponenseket 7 perc alatt sikerült szelektíven meghatározni (SOEROES, 2005b).

### **2.6.2.2 Fordított fázisú ionpárképző kromatográfia**

Az arzénkomponensek elválasztására egyaránt használnak anionpár- és kationpárképző kromatográfiás módszereket. Az állófázis egy fordított fázisú töltet, amelynek felülete a mozgófázisnál apolárisabb. A vegyületek retencióját és a szelektivitást a mozgó fázisba adagolt hidrofób részt tartalmazó ionpárképző reagens biztosítja. A módszer előnye, hogy a semleges és a töltéssel rendelkező vegyületek egyaránt elválaszthatóak egymástól. Fontos, hogy a hidrofób ion töltése mindig ellentétes legyen a meghatározandó ion töltésével. A legáltalánosabban

használt ionpárhépző reagensek hosszú szénláncú alkil ionok (alkil-szulfonát), koncentrációjuk a mozgófázisban általában 20mM vagy annál kevesebb.

Az elválasztást elsősorban az alábbi paraméterek befolyásolják:

- az ellentétes ion hidrofóbicitása
- az ionpárhépző koncentrációja
- puffer fajtája és koncentrációja
- mozgófázis ionerőssége és pH-ja
- az állófázis tulajdonsága

Az  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$ ,  $\text{MA}^{\text{V}}$ ,  $\text{DMA}^{\text{V}}$  elválasztásához főként a tetrabutil-ammónium-hidroxidot és tetrabutil-ammónium-foszfátot használják. Az elúciós sorrend minden esetben  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{DMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{MA}^{\text{V}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$  függetlenül az elválasztáshoz használt fordított fázisú oszlop típusától. A négy komponens elválasztásának optimális pH tartománya pH=5.0 és pH=7.0 között van. Ebben a tartományban az  $\text{As}^{\text{III}}$  ( $\text{pK}_a=9.2$ ) semleges formában van jelen és a holtterfoggal eluálódik. Az arzenit visszatartása az oszlopon pH=9.2 felett kismértékben megnő, így elválasztható az ilyen körülmények között visszatartással nem rendelkező ikerionos formában található AB-től (THOMAS, 1995). Mester és Fodor didodecil-dimetilammónium-bromidot (DDAB) használtak  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{DMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{MA}^{\text{V}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$  meghatározására. A négy komponenst 8 perc alatt választották el egymástól (MESTER, 1996). Az arzén metabolizációs vizsgálatához ki kellett terjeszteni az elválasztandó komponensek körét a két köztes bomlási termékre, a  $\text{MA}^{\text{III}}$ -ra és a  $\text{DMA}^{\text{III}}$ -ra (LE, 2000a). Le és csapata által alkalmazott mozgófázis 5 mM-os tetrabutil-ammónium-hidroxidot, 3 mM-os malonsavat és 5% metanolt tartalmazott, mellyel a vizeletben leggyakrabban jelenlévő 6 arzénkomponenst 7 percen belül sikerült elválasztani. A módszert később rutinszerűen alkalmazták toxikológiai és epidemiológiai vizsgálatok során. Több publikáció is született, ahol tetraetil-ammónium-hidroxidot (TEAH), mint ionpárhépzőt használtak az AB és arzenocukrok elválasztására. Ezt a módszert használták a vizelet arzéntartalmában, tengeri moszat fogyasztás hatására bekövetkező változások nyomon követésére (MA, 1998), valamint különböző környezeti minták arzénspecieszeinek meghatározására (KOCH, 2000). A kationos arzénkomponensek elválasztására ionpárhépzőként pentán- (ACKLEY, 1999), hexán- (LE, 1997), heptán- és dodecilszulfonátot (BEAUCHEMIN, 1988) használtak. Le és munkatársai 10 mM hexánszulfonátot és 1 mM TEAH-t tartalmazó kevert mozgófázis alkalmazásával 12 perc alatt 7 arzénkomponenst ( $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$ ,  $\text{MA}^{\text{V}}$ ,  $\text{DMA}^{\text{V}}$ , AB, AC, TETRA) választottak el.

Nagyszámú környezeti és biológiai minták vizsgálatánál fontos paraméter az egy mintára eső mérési idő. Az  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{DMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{MA}^{\text{V}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$  elválasztása 250 mm hosszúságú és 4.6 mm átmérőjű oszlop használata esetén általában 8-10 percet vett igénybe. Új irányvonalnak számított az

arzénspeciációban a komponensek lehető leggyorsabb elúciójának elérése. Le és munkatársai két előtét oszlopon 2 perc alatt négy komponenst választottak el (LE, 1998), míg Wangkarn és kutatócsapata egy 2.1 mm átmérőjű analitikai oszlop alkalmazásával ért el hasonló eredményeket (WANGKARN, 2000). Wrobel és munkatársai heptánszulfonátot alkalmazva a négy anionos komponens mellett az AB-t is el tudták választani egymástól mindössze 4 perc alatt (WROBEL, 2002). Annak ellenére, hogy a módszer kellően gyorsnak bizonyult a rutin analitikában, a környezeti minták esetén az arzenát és a metil-arzenát közötti felbontás a mátrixhatás miatt nagy mértékben csökkent. Ez felveti azt a kérdést, hogy vajon meddig érdemes csökkenteni a retenciós időt. Hiába növeljük az egységnyi idő alatt megmért minták számát, ha az összetettebb mintamátrix hatására az elválasztás hatékonysága nagymértékben romlik.

Az előző fejezetben már említettem, hogy a tio-arzenocukrok az aniocserélő oszlopokon sokkal jobban visszatartódnak, mint az analóg oxigéntartalmú arzénkomponensek. Ez feltehetően az As=S kötés és az analitikai oszlop közötti nem ionos kapcsolatnak köszönhető, ahol a kevésbé poláros tio-arzénkomponensek kölcsönhatásba lépnek az állófázis hidrofób részével. Az ioncserés kromatográfia esetén a mozgófázis metanolkoncentrációjának növelésével nagymértékben csökkenthető a komponensek retenciója, ami szintén arra utal, hogy a molekulák megoszlását a mozgó és az álló fázis között az ionos tulajdonságokon kívül a hidrofobicitás is nagymértékben befolyásolja. Ez felveti azt a lehetőséget, hogy a kéntartalmú arzénkomponensek meghatározására a fordított fázisú elválasztás alkalmasabb lehet, mint az ioncserén alapuló elválasztás. Raml és munkatársai fordított fázisú oszlopon ionpárgépző reagens alkalmazása nélkül 8 kéntartalmú arzénkomponenst 14 perc alatt választottak el (RAML, 2006).

### **2.6.2.3 Ionkizárásos és méretkizárásos kromatográfia**

Az ionkizárásos kromatográfiában, ha a vizsgálandó anyag nincs ionvisszaszorított állapotban, nem tud bejutni az állófázis pórusaiba az ioncserélő gyantán rögzített töltések taszítása miatt, mert az ion és az ioncserélő töltése megegyezik. Ennél az elválasztástechnikai módszernél szintén nagy ioncserélő-kapacitású erős kation- vagy anioncserélő töltetet alkalmaznak. Ez utóbbi azonban jóval ritkább. Közös jellemzőjük, hogy az ioncserélő kapacitása független a mozgófázis pH értékétől és a töltetek kevésbé nyomásállóak (FEKETE, 2003). Negatív töltésű arzénkomponensek elválasztása anionos szulfonát funkciós csoportot tartalmazó tölteten történik. Az ionkizárásos kromatográfiában három különböző kölcsönhatás érvényesül egyszerre: ionkizárás, ioncsere, hidrofób kölcsönhatás. Ezek a folyamatok együttesen teszik lehetővé, hogy a különböző arzénkomponensek elválaszthatók legyenek egymástól. Nakazato és munkatársai karboxilált metakrilát gyantán végezték el az  $\text{As}^{\text{V}}$ ,  $\text{MA}^{\text{V}}$ ,  $\text{DMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{As}^{\text{III}}$  és az AB

elválasztását mindössze 13 perc alatt. A módszer hátránya, hogy a TMAO 40 percnél, míg az AC és a TETRA elválasztás nélkül 60 percnél eluálódott (NAKAZATO, 2000).

A méretkizárásos kromatográfia esetén a molekulákat meghatározott pórusátmérőjű tölteteken méretük szerint választjuk el. Az elválasztás azáltal valósul meg, hogy a nagy molekulák kizáródnak, míg a kisebb méretű molekulák különböző ideig tartózkodnak a pórusokban. Ehhez olyan állófázis szükséges, amelynek felülete inaktív, azaz semmilyen kölcsönhatást nem alakít ki az elválasztandó molekulákkal. Méretkizárásos kromatográfiát leginkább olyan vizsgálatok esetében használnak, amikor nagy molekulatömegű mátrixkomponensek elválasztása a cél (MCSHEEHY, 2001).

### **2.6.3 Detektálási módszerek az arzénspeciációban**

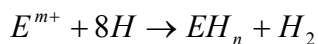
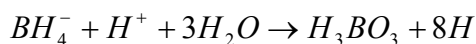
A korszerű műszeres analitikában a detektálási módszereket alapvetően két fő csoportba sorolhatjuk. Az elemspecifikus detektorok előnye a nagy érzékenység és szelektivitás, míg a molekulaspecifikus detektorok fő jellemzője, hogy információt nyújtanak a vizsgált anyag szerkezetéről. Az arzénmódosulatok analitikai vizsgálata esetén a két detektálási mód karöltve igen fontos szerephez jut. Toxikológiai vizsgálatok során, amikor legtöbb esetben a vizsgálandó arzénkomponensek csak nyomokban találhatók a mintákban, az elemszelektív detektálás megfelelő érzékenységet biztosít. A műszerek egyre javuló érzékenységének és a metabolizációs folyamatok megismerésének köszönhetően újabb, eddig ismeretlen arzénvegyületek jelenlétét sikerült kimutatni különböző környezeti mintákból. Ezen vegyületek szerkezetének megismerésére viszont a különféle molekulaszelektív detektorok adnak lehetőséget. Az atomspektrometriában atomizálásra, illetve ionizálásra egy nagy energiájú gerjesztő forrást alkalmaznak, ahol a molekulák elbomlanak és csak a kívánt elemek (jelen esetben az arzén) kerülnek detektálásra. Az arzénspeciációban leginkább elterjedt korszerű detektorok az atomfluoreszcens spektrométerek (AFS) és az induktív csatolású plazma tömegspektrométerek (ICPMS). Ezzel szemben a molekulaspecifikus detektorok - melyek szintén tömegspektrométerek - lágy ionizációs technikákat alkalmaznak, ahol a vizsgált molekula roncsolás nélkül, ionos állapotban jut be a detektorba. Ez egyaránt lehetővé teszi az ismeretlen molekulák szerkezetének meghatározását és az ismert vegyületek standard oldatok alkalmazása nélküli pontos azonosítását.

### 2.6.3.1 Hidridképzéses - atomfluoreszcens - spektrométer (HG-AFS)

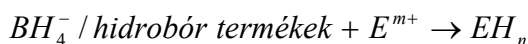
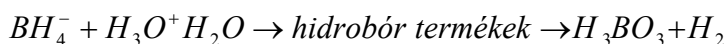
Ellentétben a kezdetben használt atomabszorpció (AAS) és atomemissziós (AES) módszerekkel az atomfluoreszcens (AFS) spektrofotometria egyre nagyobb népszerűsége tett szert az arzénspeciációval foglalkozó kutatók körében. A detektor szelektivitásának, kedvező jel/zaj viszonyának, valamint az alacsony árak és működési költségeknek köszönhetően kiváló alternatívának bizonyult a tömegspektrometriás technikák mellett.

A kapcsolt rendszerek alkalmazása esetén komoly problémát jelent a minta olyan formába való átalakítása, hogy azt megfelelő módon a detektorba juttathassuk. Woller és munkatársai (WOLLER, 1995) HPLC-AFS kapcsolást alkalmaztak arzénkomponensek meghatározására, ahol az elválasztást követően ultrahangos porlasztással juttatták a mintát a detektorba. Ezzel a kapcsolással a vizsgált anionos arzénkomponensekre ( $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{DMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{MA}^{\text{V}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$ ) és kationos módosulatokra (AB, AC) az abszolút kimutatási határ 20-50 ng között váltakozott 250  $\mu\text{L}$  injektálási térfogat mellett (MESTER, 1997).

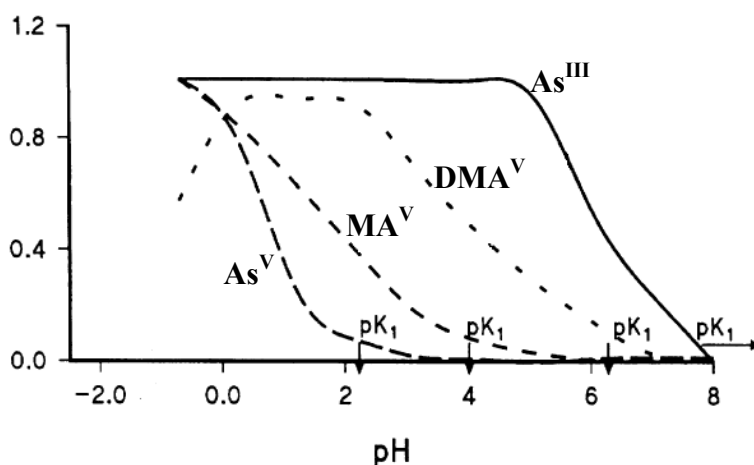
A mátrixkomponensek hatására bekövetkező fényszóródásnak és háttérnövekedésnek köszönhetően az AFS rendszereket legtöbbször hidridfejlesztéssel összekapcsolva alkalmazzák. A módszer alapja, hogy az előzetesen HPLC-vel elválasztott arzénmódosulatokat illékony komponensekké alakítva gázfázisba visszük, melyet egy folyadék-gáz szeparátorban a mátrixtól elválasztva a detektorba juttatunk. Ezzel a módszerrel az eddig fő problémának számító spektrális interferenciák kiszűrhetőkké váltak. Az arzén-hidridek előállítása savas közegben nátrium-tetrahidroborát ( $\text{NaBH}_4$ , THB) segítségével történik. Az egyik elmélet szerint a hidrid kialakításáért a THB hidrolízise során keletkezett naszcensz hidrogén a felelős (KUMAR, 2005). Az elmélet alapjául szolgáló egyenlet a következő:



ahol  $m+$  a mérendő elem oxidációs száma, az  $n$  pedig a képződött hidrid koordinációs száma. Egy másik, újabb elmélet szerint a folyamat során molekuláris hidrogén keletkezik. Izotóp jelzéses technikával megállapították, hogy a meghatározandó elem a hidrogént a THB hidrolízise során keletkezett köztes hidrobór vegyületektől kapja. Ezek alapján az egyenlet a következők szerint módosul (KUMAR, 2005).



A hidridképzéshez szükséges savas közeg kialakítása leggyakrabban sósav hozzáadásával történik, emellett használnak még salétromsavat, kénsavat, ecetsavat, citromsavat, oxálsavat és egyéb szerves savakat. A THB oldat stabilitását NaOH hozzáadásával biztosítják (POHL, 2004). A hidridképzés hatásfokát, az AFS detektor érzékenységét, kimutatási határát és precizitását nagymértékben befolyásolja a felhasznált oldatok koncentrációja és áramlási sebessége. A THB és a mérendő arzénkomponensek közötti reakció emellett jelentősen pH függő. A folyamat pillanatszerű lejátszódásához a vizsgálandó komponenseknek teljesen protonált állapotban kell lenniük. Tekintve, hogy az arzenit disszociációs állandója 9.2, a reakció enyhén savas közegben is lejátszódik. Ezzel szemben az arzenát 2.3-as pKa értéke megköveteli, hogy a hidriképzési folyamatot nagyon alacsony pH-n ( $pH < 2$ ) végezzük. A **3. ábrán** négy anionos arzénkomponens hidriképzési hatásfoka látható a pH függvényében.



**3. ábra** Az anionos komponensek hidridképzési hatásfoka a pH függvényében (HOWARD, 1997)

Azokban a mintákban, ahol csak a két szervetlen arzénkomponens van jelen (pl. vízminta), a folyamat pH függése lehetővé teszi az arzenit és az arzenát meghatározását előzetes elválasztástechnikai módszer alkalmazása nélkül. Ebben az esetben a vizsgálatot két különböző pH-n kell elvégezni. Alacsony pH-n az arzenit és az arzenát együttes koncentrációját határozzuk meg, míg magasabb pH-n ( $pH=5$ ) csak az arzenitet tudjuk detektálni. A kettő különbsége adja meg a minta arzenáttartalmát (HOWARD, 1997).

Figyelembe véve, hogy a TMAO-t kivéve a többi kationos arzénkomponens, illetve az arzenocukrok nem képesek illékony arzén-hidrid képzésére. A HPLC-HG-AFS csatolt technika alkalmazási lehetősége főként a már említett anionos komponensek vizsgálatára korlátozódik (NAKAZATO, 2000). Ha azonban a hidridképzési folyamatba egy oxidációs lépést is beiktatunk, az addig nem hidridaktív módosulatok meghatározására is lehetőség nyílik. Ebben az esetben sav hozzáadása előtt egy külön ágon perszulfátot ( $K_2S_2O_8$ ) adagolunk az efluenshez, majd az oxidációt elősegítve a mintát mikrohullámnak (LE, 1992) vagy UV sugárzásnak (HOWARD, 1993) tesszük ki. Az előzőek alapján látható, hogy a különböző arzénkomponensek hidridképzésén alapuló vizsgálata során számos paramétert figyelembe kell vennünk, melyekre a mérőrendszert optimalni kell. Az irodalomban fellelhető közlemények alapján a THB optimális koncentrációja 1-3 m/v% között, a sósav optimális koncentrációja 1.5-3.5 mol/L között, az oxidáló reagens optimális koncentrációja pedig 0.5-2.5 m/v% között váltakozik (SUNER, 2000).

A hidridképzési folyamatot minden esetben jellemzi egy bizonyos hatásfok, amely az arzénmódosulatoktól függően változó. Ez azt eredményezi, hogy a különböző vegyületek azonos koncentrációjára kapott detektor jel legtöbb esetben eltérő, ezért minden egyes komponens mennyiségi meghatározásához szükségünk van standard oldatokra. A HPLC-HG-AFS kapcsolt technikák esetében a komponensek azonosítása kizárólag retenciós idő alapján történik, mely szintén megköveteli a referencia oldatok alkalmazását. Annak ellenére, hogy a hidridképzés során a mátrix nagy részét leválasztjuk a vizsgálandó komponensekről a mintában jelen lévő egyéb illékony és hidridaktív vegyületek zavaró hatása miatt a mennyiségi vizsgálatoknál sok esetben elengedhetetlen a standard addíciós kalibráció alkalmazása (SANCHEZ-RODAS, 2002). Biológiai minták esetén a standard addíciós kalibráció a mátrix jelcsökkentő hatásának figyelembe vétele mellett, a retenciós idők eltolódásának nyomon követésére is kiválóan alkalmas. Elemszelektív detektorról lévén szó, minden olyan vegyületet detektálni tudunk a mintában, amely tartalmaz legalább egy arzén atomot és képes hidrid kialakítására. A technika hátránya, hogy standard oldatok hiányában az ismeretlen arzénkomponensek mennyiségi meghatározása nem végezhető el.



### **2.6.3.2 Induktív csatolású plazma tömegspektrométer (ICPMS)**

Számba véve az arzénspeciációban használatos különböző ionforrásokat az induktív csatolású plazma mind közül a leghatékonyabb. A legtöbb elemhez hasonlóan arzénre is legalább két nagyságrenddel érzékenyebbek az ICPMS készülékek, mint az ugyancsak ICP ionforrást használó AES detektorok (VANHOE, 1994). A tudományos közlemények legtöbb esetben 1 µg/L alatti kimutatási határról számolnak be egyes arzénkomponensek esetében (LEERMAKERS, 2006). A kimutatási határ mellett nem elhanyagolható szempont a multielemes detektálási lehetőség, az akár 6 nagyságrendnyi dinamikus tartomány illetve a készülék robusztussága. Az ICPMS készülékek, köszönhetően az általánosságban használatos pneumatikus porlasztók ml/perces működési sebességének, alkalmasak HPLC-hez való csatolásra. Emellett a kis áramlási sebességgel (100 µL/perc) működő porlasztókkal felszerelt készülékek kiválóan csatlakoztathatók a kis átmérőjű (1 mm), úgynevezett 'mikrobore' oszlopokkal működő HPLC rendszerekhez (SUN, 2003; WOLLER, 1998). A HPLC-ICPMS műszerkapcsolásnak legnagyobb hátránya a detektor alapvető jellegéből adódik. A fordított fázisú kromatográfiában előszeretettel alkalmazott nátrium- és kálium-foszfát pufferek mozgófázisként való alkalmazása nem javasolt. A puffer nem illékony sótartalma ugyanis könnyedén kirakódhat a mintavevő kónuszcsontra és a lencsékre, fokozatosan eltömítve a bemeneti nyílást, ami a jel egyre nagyobb mértékű csökkenésével jár. Ezért ezeket a mozgófázisokat általában ammónium-foszfát vagy ammónium-karbonát tartalmú eluensekkel helyettesítik (B'HYMER, 2002). A kromatográfiás elválasztástechnikai módszerek sok esetben alkalmaznak szerves oldószereket, főként metanolt a mozgófázisban. A metanol koncentrációjának növelése javítja az ionizáció hatékonyságát, azonban egy bizonyos metanoltartalom felett a „hagyományos” módon kialakított plazma (pl. nem alkalmazunk oxigént) instabillá válik és összeomlik (LARSEN, 1998a).

A HPLC-ICPMS esetében az arzénkomponensek azonosítása szintén retenciós idő alapján történik. A módszer nagy előnye a hidridképzéses technikával szemben, hogy a különböző arzénvegyületek esetén azonos koncentrációra a detektor ugyanakkora válaszjelet ad. Ez lehetővé teszi az eddig még nem detektált, ismeretlen arzénkomponensek mennyiségi meghatározását izokratikus elválasztás alkalmazása esetén. Gradienselúció során azonban az eltérő eluens-összetételből eredően a porlasztási viszonyok változhatnak, megváltoztatva ezzel a plazmába jutó minta mennyiségét is. Ebben az esetben az ismeretlen komponenshez legközelebb eső ismert arzénvegyület standard oldatára kalibrálunk, mellyel csak félkvantitatív eredményhez juthatunk.

Az arzén monoizotópos tulajdonsága miatt az  $m/z=75$ -ös tömegszámon jelentkező spektrális és izobár zavarások esetén nem áll rendelkezésre olyan alternatív izotóp, melyen az arzént

monitorozni tudnánk. A leggyakoribb zavaró hatást az ugyancsak  $m/z=75$ -ös tömegű  $^{40}\text{Ar}^{75}\text{Cl}$  jelenti, mellyel főként nagy sótartalmú minták (pl.: tengervíz, vizelet) vizsgálata esetén kell számolnunk. Arzénspeciációval foglalkozó kutatók több lehetséges alternatívát dolgoztak ki a probléma kiküszöbölésére. Járható útnak bizonyult a minta előzetes kezelése, mely lehet szilárdfázisú extrakció (INOUE, 1999) oldószeres extrakció (MOLDOVAN, 1998) vagy egyszerű hígítás (LINTSCHINGER, 1998; ZHENG, 1998). Azt azonban szem előtt kell tartani, hogy a különböző mintakezelések esetén fennáll annak a veszélye, hogy a mintában található arzénmódosulatok eredeti megoszlása megváltozhat. Továbbá a túlzott mértékű hígítás megnehezítheti az élőlényekben gyakran ppb-s koncentrációtartományban jelen lévő arzénkomponensek megbízható vizsgálatát. Ebdon és kutató csapata az  $\text{ArCl}$  interferenciát plazmába vezetett nitrogén segítségével csökkentette (EBDON, 1999), míg Ritsema és munkatársai kromatográfiásan választották el a kloridionokat, melyek gradienselúciónak köszönhetően az arzénkomponenseket követően mosódtak le az oszlopról (RITSEMA, 1998). Az ICPMS multieleemes tulajdonságát kihasználva az  $m/z=75$ -re kapott jelet különböző számítási módokkal, úgynevezett interferencia egyenletekkel is korrigálhatjuk, melyek egyes esetekben több lépésből is állhatnak. Mivel a klórnak két izotópja létezik, az  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$  mellett  $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$  is képződik a plazmában, melyek aránya ( $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl} / ^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$ ) megegyezik a klór természetes izotópjainak arányával ( $^{35}\text{Cl} / ^{37}\text{Cl}$ ). Az  $m/z=75$  mellett tehát az  $m/z=77$ -et is monitorozzuk, mely adódhat az  $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$ -ből, illetve a minta  $^{77}\text{Se}$  tartalmából. A  $^{82}\text{Se}$  izotópot monitorozva megállapíthatjuk, hogy valóban  $\text{ArCl}$  interferenciáról van e szó. Az újabb ICPMS készülékek már rendelkeznek úgynevezett ütközési/reakció cellával, amely a kvadrupól analízátor előtt helyezkedik el. A cellába többek között hidrogént vagy héliumot vezetnek, melyekkel a poliatomos zavarás csökkenthető illetve megszüntethető (LEONHARD, 2002; TANNER, 2000).

A HPLC-ICPMS technika kimutatási határa hidridfejlesztési lépés közbeiktatásával tovább javítható, ami természetesen együtt jár a hidridtechnika hátrányainak adaptálásával is. A mérőrendszer komplexitása nagyobb hibalehetőséget rejt magában, míg a hozzáadott reagensekből (főként THB) származó esetleges szennyeződések a háttér növekedését eredményezhetik. A módszert vizeletminták (WEI, 2001), vízminták (NAKAZATO, 2002) és biológiai szervezetek (DAGNAC, 1999) vizsgálatára egyaránt használták. Előzetes oxidációs lépés közbeiktatása nélkül a nem hidridaktív arzénkomponensek meghatározása HPLC-HG-ICPMS kapcsolás alkalmazása esetén sem lehetséges, ami nem feltétlenül jelent hátrányt. Sok esetben a minta nagy AB tartalma miatt a hozzá közel eluálódó  $\text{As}^{\text{III}}$  és DMA meghatározása HPLC-ICPMS technikával nem megoldható. Hidridképzéses mintabevitel alkalmazása esetén azonban a széles AB csúcs nem zavarja az esetlegesen csak nyomokban jelen lévő egyéb, hidridaktív módosulatok meghatározását (SOEROES, 2005a).

### 2.6.3.3 Molekula tömegspektrométer

Az utóbbi néhány évben a molekula tömegspektrometria (szerves tömegspektrometria) szolgáltatta a legújabb eredményeket az arzénspeciációs kutatások terén, melyek között nagy számban lelhetők fel az új módosulatanalitikai módszerek kidolgozására és az eddig még ismeretlen arzénvegyületek azonosítására irányuló törekvések. A molekulaionokat előállító lágy ionforrás lehet elektroporlasztásos (electrospray, ES), atmoszférikus nyomáson működő kémiai ionizációs (atmospheric pressure chemical ionisation, APCI), gyors-atom bombázásos (fast atom bombardment, FAB) és elektron ütköztetési (electron ionisation, EI). Az ionforrásban keletkezett molekulaionokat széttörve, azok tömegspektruma alapján további szerkezeti információhoz jutunk. Mivel az arzén csak egy izotóppal rendelkezik, a tömegspektrum természetes izotópeloszlás alapján történő értelmezése nem lehetséges. Corr és munkatársai által publikált tanulmány egyike volt azoknak az arzénspeciációs munkáknak, amelyek elsőként mutatták be a folyadékkromatográfia (LC) és az elektroporlasztásos molekula tömegspektrométer (ES-MS) kapcsolásának gyakorlati alkalmazhatóságát algában található arzénkomponensek jellemzésén keresztül (CORR, 1996). Az arzénmódosulatok vizsgálatára az elektroporlasztásos ionforrással ellátott molekula tömegspektrométerek (ESMS) terjedtek el. Az egy kvadrupóllal rendelkező készülékek esetében (single quadrupole) az anyaion tördelése az ionforrásban megy végbe. Az ionizációs energiától függően az ESMS egyaránt alkalmazható protonált molekulák és  $\text{As}^+$  ionok detektálására. Ez azt jelenti, hogy HPLC után kapcsolva a készüléket, a kromatográfia során detektált csúcsokhoz tartozó arzéntartalmú vegyületekről molekulatömeg információt is nyújt. Kimutatták, hogy az  $\text{As}^+$  ionok detektálása esetén a nagy energiájú porlasztás mellett fontos a porlasztógáz tisztasága, mivel 0.1% oxigéntartalom felett a domináns termékion az  $\text{AsO}^+$  volt (KUEHNELT, 2003b). Ezt a kettős detektálási módot alkalmazta Pedersen is, aki különböző algafajokban található arzenocukor módosulatok vizsgálatát végezte el (PEDERSEN, 2000). Annak ellenére, hogy a csak egy kvadrupólt tartalmazó tömegspektrométerek kiváló eszköznek bizonyultak az arzénspeciációban, a témával foglalkozó kutatók előnyben részesítették az úgynevezett tandem tömegspektrométereket. Ezek három sorba kötött kvadrupólt (MS/MS) vagy kvadrupól-repülési idő (QTOF) analízátort tartalmaznak. Korábban az ESMS technikákat kimutatási határuk miatt jórészt csak minőségi meghatározásra alkalmazták. A három kvadrupólt tartalmazó molekula tömegspektrométerek azonban új lehetőséget kínáltak az arzénmódosulatok mennyiségi meghatározására. Az úgynevezett MRM mód, amely az angol 'Multiple Reaction Monitoring' kifejezés rövidítéséből származik, sokkal szelektívebb, tökéletes kromatográfias elválasztást nem feltétlen igénylő meghatározást és az ICPMS technikákkal vetekedő kimutatási határt tesz lehetővé. A szelektív anyaion  $\rightarrow$  fragmentum átmenet monitorozása miatt a komponensek elválasztása csak abban az

esetben szükséges, ha a két vegyület azonos átmenetekkel rendelkezik (NISCHWITZ, 2006a). Egyéb esetekben a kromatográfia során csak arra kell törekednünk, hogy a meghatározandó komponensek a mátrixtól elváljanak. Továbbá a szelektív fragmentációs átmenetek monitorozása lehetővé teszi a vegyületek azonosítását standard oldat nélkül, ami az első meghatározó lépés az ismeretlen vegyületek karakterizálását tekintve. Az utóbbi években számos arzénkomponens azonosítását végezték el HPLC-ESMS készülékkel (FRANCESCONI, 2002a; MCSHEEHY, 2003). A TMAP jelenlétét pl. tengeri halakból már 1993-ban kimutatták (LARSEN, 1993), az azonosítását azonban csak 2000-ben végezték el (FRANCESCONI, 2000).

Számos publikáció foglalkozik az eddig már ismert szerkezetű arzénkomponensek azonosításával különböző mintamátrixokból. Pergantis és munkatársai arzenocukrok azonosítására alkalmaztak FAB-MS/MS és ES-QTOF tömegspektrométereket pozitív  $[M+H]^+$  és negatív  $[M-H]^-$  ionizációs módban (PERGANTIS, 1997; PERGANTIS, 2000). Nischwitz és társai HPLC-ESMS/MS rendszert használva elsőként detektáltak AB-t tengeri algából, amelyet a nagy mennyiségben jelen lévő arzenocukor koelúciója miatt HPLC-ICPMS vizsgálatok során nem tudtak kimutatni (NISCHWITZ, 2005). A tio-arzenocukor-foszfát (FRICKE, 2004), -szulfonát és -szulfát (KAHN, 2005) jelenlétét tengeri kagylókban szintén HPLC-ESMS-sel igazolták. Sloth és munkatársai az AB bioszintézisében feltételezetten résztvevő DMAA és DMAE arzénkomponenseket mutatták ki 37 különböző tengeri eredetű mintából (SLOTH, 2005).

A lágy ionizációs technikák egyik nagy hátránya a mátrixhatás, mely a különböző arzénkomponensek ionizációs képességének visszaszorításában nyilvánul meg (CORR, 1996). Mátrix érzékenysége miatt a technika alkalmazhatóságának feltétele sok esetben a minta előzetes tisztítása és a vizsgálandó komponens dúsítása. A legáltalánosabban alkalmazott megoldás az off-line és on-line kromatográfias tisztítás, illetve a többdimenziós kromatográfia alkalmazása (MCSHEEHY, 2002). Madsen és munkatársai (MADSEN, 2000) egy standardizált algakivonat arzenocukor komponenseinek mennyiségi analizését végezték el, összehasonlítva az ICPMS és ESMS készülékkel kapott eredményeket. A szerzők megállapították, hogy standard addíciós kalibrációs módszerrel nincs különbség a kapott értékek között, a mátrix jelcsökkentő hatása kisebb, mint 8%. Ezzel szemben egyes tanulmányok erős mátrixhatásról számolnak be osztrigában található arzenocukor-foszfát vizsgálata esetén (SANCHEZ-RODAS, 2002). További hátrány az elválasztás során alkalmazott mozgófázis nagy sókoncentrációja. Fennáll ugyanis a kirakódás veszélye az ionforráson és a kónuszon, csökkentve ezzel a módszer érzékenységét. Az ICPMS detektálás esetén alkalmazott HPLC-s technikák nagy része nem kompatibilis az ESMS technikákkal, ezért teljesen új, illékony mozgófázisokat alkalmazó elválasztástechnikai módszerek kidolgozása válik szükségessé. A szerves MS térhódításával

egyre több olyan tanulmány született, amelyekben a kutatók a különböző arzénkomponensek tömegspektrumát, jellemző fragmens ionjait és azok képződéséhez szükséges ütközési energiákat határozták meg standard oldatokban (LARSEN, 2001; MIGUENS-RODRIGUEZ, 2002; NISCHWITZ, 2006b).

Ma az arzén módosulatanalitikában alkalmazott technikák döntő többségét az elemszelektív detektáláson alapuló módszerek alkotják. A publikált eredmények azonban nagymértékben hozzájárulnak ahhoz, hogy a további fejlesztéseknek köszönhetően a közeljövőben a HPLC-HG-AFS és HPLC-ICPMS technikákhoz hasonlóan a HPLC-ESMS technikák is az arzénspeciáció szerves részét képezzék.

## **2.6.4 Minőségbiztosítás az arzén módosulatanalitikájában**

A módosulatanalitikai eredményekkel szemben fontos elvárás, hogy megfelelő minőségű, megbízható, nemzetközi vonatkozásban is összevethető információt szolgáltatassanak. A mérés eredménye a „mért érték”, mely soha nem azonos a „valódi értékkel”, hiszen számos hibával terhelt. Az analitikai mérésből származó hibák jelentősek lehetnek, de számottevő a mérést megelőző (pl. mintavétel, mintakezelés), valamint a mérést követő (pl. adatkezelés) folyamatokból adódó hibák mennyisége is. A mérés célja a hibák minimalizálása, a valódi érték minél pontosabb megközelítése.

### **2.6.4.1 Standard oldatok az arzénspeciációban**

Általánosságban elmondható, hogy az arzénspeciációval foglalkozó kutatók nagy része a szervetlen kémia és az elemanalitika területén kezdte kutatói tevékenységét, ahol a vizsgálatokhoz mind egyelemes, mind multielemes kalibrációs és standard törzsoldatok sora állt a rendelkezésükre. Sajnos ez az arzénvegyületek esetében egyáltalán nem mondható el. A környezetben nagyszámban előforduló és egyre több újonnan azonosított arzénmódosulat közül csak néhány érhető el standard vegyület formájában. A szervetlen  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$ , valamint a  $\text{MA}^{\text{V}}$  és a  $\text{DMA}^{\text{V}}$  kereskedelmi forgalomban kapható és könnyen hozzáférhető. A kationos arzénkomponensek szintézis útján előállíthatóak, azonban ezek közül is csak néhány van kereskedelmi forgalomban. Általában a kutató laborok maguk állítják elő és sok esetben szívettség útján cserélnék gazdát az arzénrel foglalkozó kutatók körében. Az arzenocukrok közül csak az oxo-arzenocukor-glicerolnak a szintézise ismert, a többi módosulatot általában tengeri algákból vagy kagylókból izolálják, majd több lépésben tisztítják.

Az ICPMS technika esetében a detektor által adott válaszjel az arzéntartalommal arányos, ami lehetőséget ad az olyan arzénkomponensek mennyiségének meghatározására is, melyekből nem áll rendelkezésre standard oldat. Az arzénkomponensek eltérő hidridképzési hatásfoka a mennyiségi vizsgálatnak így módon történő megvalósítását HPLC-HG-AFS módszerek esetében nem teszi lehetővé. A retenciós idő alapján történő azonosítás miatt azonban mindkét módszernél elengedhetetlen a standard oldatok alkalmazása. Léteznek alternatív megoldások a komponensek azonosítására, ezek azonban csak átmeneti lehetőséget biztosítanak a kutatóknak. Schmeisser és munkatársai például tio-arzenocukor-foszfát és -glicerol jelenlétét bizonyították kagylómintákban anélkül, hogy rendelkeztek volna a megfelelő standard oldatokkal. Feltételezve, hogy az ismeretlen komponensek tio-arzenocukrok voltak, a mintát  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal való kezelés után ismételten megvizsgálták. A kezelés következtében az ismeretlen csúcsok eltűntek, míg az oxo-arzenocukor-foszfát és -glicerol mennyisége megnőtt a mintában. A jelenség a tio-arzenocukroknak az erős oxidatív kezelés következtében oxo-arzenocukrokká való alakulásával magyarázható (SCHMEISSER, 2004). A molekula tömegspektrometria esetében a mennyiségi meghatározás standard oldatok hiányában lehetetlen, azonban a szelektív detektálási módszernek köszönhetően az azonosítás standard oldatok nélkül is elvégezhető.

A tendencia azt mutatja, hogy egyre inkább elterjedt az olyan anyagminták standardként való alkalmazása, melyek karakterizálását a kutatók saját maguk végezték el. Madsen és munkatársai például egy tengeri alga fajt (*Fucus serratus*) dolgoztak fel, mely  $\text{DMA}^{\text{V}}$ -t,  $\text{As}^{\text{V}}$ -ot és négy oxo-arzenocukrot tartalmazott (MADSEN, 2000). Az arzénkomponensek izolálását és az extraktum arzénmódosulat-eloszlásának meghatározását követően ezt az anyagmintát a mai napig előszeretettel alkalmazzák a kutatók arzenocukor vizsgálatok esetén.

#### 2.6.4.2 Módszerek validálása

Egy analitikai módszer fejlesztése során ellenőriznünk kell, hogy a módszer alkalmas-e a mérési célra, kézből tudjuk-e tartani, valamint a módszer az alkalmazni kívánt körülmények között tudományosan megalapozott-e. A módszert kidolgozó analitikus kísérletekkel bizonyítja, hogy az általa vizsgált minták körében az általa alkalmazott módszer megbízható eredményt ad. Ezeket az ellenőrzéseket gyűjtőnéven validálásnak, érvényesítésnek nevezzük. A validálás során az alábbi teljesítmény-jellemzőket kell meghatározni:

- Szelektivitás és specifikusság
- Linearitás
- Precizitás (ismétlőképesség, reprodukálhatóság)
- Pontosság, helyesség

- Érzékenység
- Kimutatási határ
- Mérési határ
- Mérési tartomány
- Állékonyság, robusztusság

A módosulatanalitikában a teljes validálást több ok miatt is nagyon nehéz teljesíteni. A módszerek teljesítőképessége sok esetben olyannyira mátrixfüggő, hogy egy új mátrix gyakorlatilag a teljesítmény-jellemzők ismételt meghatározását és a módszer újvalidálását igényelheti. Ezért a módosulatanalitikai módszerek validálása során minden egyes köztes lépésnek (pl.: minta tárolás, kezelés) kitüntetett figyelmet kell szentelni, mivel ezek a paraméterek sok esetben nagyobb mértékben befolyásolhatják a végeredményt, mint maga a mérés. A pontosság a szisztematikus hibák elkerülésének az alapja, míg a precizitás vagy bizonytalanság az eredményeknek a teljes vizsgálat folyamán fellépő, véletlen hibákból eredő varianciája. A módosulatanalitikai módszerek lépései (extrakció, derivatizáció, elválasztás, detektálás) mind potenciális hibaforrást jelentenek. A minta kezelése során fellépő szennyeződés, a vizsgálandó komponens mennyiségében fellépő veszteség, a kalibráció során vétett hibák, valamint a mintamátrix által okozott zavaró hatások mind hozzájárulnak az eredmény végleges alakulásához. A véletlen hibák az eredmények nagy szórásában nyilvánulnak meg, ezáltal rögtön felismerhető, ha szükség van a módszer felülvizsgálatára. Ezzel szemben rendszeres hiba esetén is kaphatunk jó precizitással rendelkező értékeket, azonban ez a hiba nehezebben észrevehető és a végeredmény torzulását eredményezi. Mérésünk pontosságát különböző módon ellenőrizhetjük: az eredményeket összevethetjük egy laboron belüli, független analitikai módszerrel kapott eredményekkel vagy más laborok által kapott eredményekkel; hiteles anyagmintákat (**Certified Reference Material, CRM**) használhatunk, melyekről a következő fejezetben lesz szó. Az analitikai módszer statisztikai kontrolkártyákkal folyamatos ellenőrzés alatt tartható, mely segít az eredmények reprodukálhatóságának fenntartásában. A kontrolkártyák módosulatanalitikai vizsgálatoknál való alkalmazásával egy korábbi, az Alkalmazott Kémia Tanszéken íródott doktori disszertáció részletesen foglalkozik (IPOLYI, 2003).

#### **2.6.4.3 Hiteles anyagminták használata**

Az analitikai módszerek alkalmasságának meghatározásához hiteles anyagmintákra van szükségünk. A CRM-ek elismert nemzetközi szervezetek által, egy hitelesítési gyakorlat

keretében jóváhagyott referencia értékkel és hozzá tartozó bizonytalansági tartománnyal rendelkeznek. A hiteles anyagminták lehetővé teszik, hogy az általunk kapott eredményeket hitelesített értékkel összehasonlítsuk. Számos arzéntartalmú CRM létezik, azonban a hitelesített értékük legtöbb esetben kizárólag teljes arzéntartalomra korlátozódik. A módosulatanalitikai módszerek egyre nagyobb térhódításával azonban felmerült az igény a különböző arzénmódosulatokra hitelesített anyagminták iránt. Tekintettel arra, hogy az arzénspeciációs vizsgálatok tárgyát leginkább tengeri eredetű minták képezik, a különböző komponensekre hitelesített anyagmintákat is tengeri élőlények szöveteiből állították elő és elsősorban AB-re hitelesítették őket. Korábbi fejezetekből látható, hogy a módosulatanalitikai vizsgálatok eredményét, főként a mintaelőkészítést nagymértékben befolyásolja a mintamátrix. A CRM-ek használata során ezért fontos szempont, hogy olyan hiteles anyagmintát alkalmazzunk, melynek a mátrixa a legjobban hasonlít a vizsgálandó mintáéhoz. Az Európai Közösség számos körmérést szervezett 1989. és 1995. között, melyek célja arzénmódosulatokra hitelesített különböző mátrixú CRM-ek előállításuk volt. 1996-ban fejezték be a BCR-626 (LAGARDE, 1999b) és a BCR-627 (LAGARDE, 1999a) elnevezésű anyagminták hitelesítését. Azóta több kutató laboratórium is bekapcsolódott a CRM előállítási folyamatba. Ilyen például a kanadai National Research Council of Canada (NRCC), mely többek között egy DORM-2 fantázianévvel ellátott és a mai napig közzéadott, AB-re és TETRA-ra hitelesített CRM-et állított elő.

A mérendő mintánk mátrixtartalmából eredő hatások kiküszöbölésére a hiteles anyagminták kalibráló standardként is használhatók. Azonban ez csak abban az esetben helytálló, ha a minta és a CRM mátrixa valamint a mérendő arzénmódosulatok is megegyeznek. Sajnos egyenlőre nagyon kevés mátrixra találunk hitelesített anyagmintákat és azok is csak néhány módosulatra vannak hitelesítve. A számunkra legmegfelelőbb anyagminta kiválasztásához egy virtuális intézetet (Virtual Institute for Reference Materials, [www.virm.net](http://www.virm.net)) hoztak létre, ahol a felhasználó mintamátrix, mérendő komponens, annak koncentrációja és más egyéb paraméterek alapján kereshet a világon forgalomban lévő CRM-ek között.



## 2.6.4.4 Teljes anyagmérleg készítése

A módosulatanalitikai vizsgálatok a kapott eredmények információtartalma szerint két fő munkafázisra oszthatók. Első lépés minden esetben a minta teljes arzéntartalmának meghatározása, majd az extrakciót követően az arzénmódosulatok vizsgálata. A két mérés együttes célja az extrakciós hatásfok kiszámítása, azaz, hogy a kinyerés után az oldatban található arzénkomponensek mekkora részét teszik ki a minta teljes arzéntartalmának. Korábban az extrakciós hatásfok meghatározása ebből a két mérési eredményből történt az alábbiak szerint:

$$\text{Extrakciós hatásfok (\%)} = \frac{\text{arzénmódosulatok összege az extraktumban}}{\text{teljes arzéntartalom a mintában}} \times 100$$

Sajnos a mai napig számos publikációban találkozunk ezzel a számítási móddal, ami több okból is helytelen. Egyrészt a mintaelőkészítés során (jelre töltés, szűrés, bepárlás, visszaoldás) esetlegesen fellépő veszteségek vagy szennyeződések miatt az extraktum valódi arzéntartalma eltérhet az eredeti értéktől. Másrészt az egyenlet nem veszi figyelembe a kromatográfiás elválasztás során véthető hibákat (integrálási hiba, oszlopvisszanyerési hatásfok, mátrixhatás stb.). Ezek alapján tehát elmondható, hogy az extrakciós hatásfoknak ily módon történő kiszámítása nagy valószínűséggel hibás eredményt fog adni. A teljes anyagmérleg felállítása ezzel szemben ezeket a hibákat hivatott kiküszöbölni. Ahhoz, hogy a teljes anyagmérleget felállítsuk, az alábbi vizsgálatokat kell elvégezni:

- Meghatározzuk a minta teljes arzéntartalmát nedves roncsolással (A) (ld.2.6.1.3.)
- Az extrakciót követően meghatározzuk a szűrt extraktum teljes arzéntartalmát nedves roncsolással (B)
- Az extrakciót követően meghatározzuk a visszamaradt üledék teljes arzéntartalmát nedves roncsolással (C)
- Kromatográfiásan meghatározzuk az extraktumban található arzénmódosulatok összegét (D)

A vizsgálatok alapján a teljes anyagmérleg felállításához az alábbi egyenletek írhatók fel:

Ha az extraktum és az üledék teljes arzéntartalmának az összege megegyezik a minta teljes arzéntartalmával, azaz

$$A = B + C,$$

akkor kijelenthetjük, hogy a mintaelőkészítés során nem lépett fel veszteség illetve nem történt szennyezés. Továbbá az extraktum teljes arzéntartalmából és az arzénkomponensek összegéből kifejezhetjük az oszlopviasszanyerési hatásfokot, melyre az alábbi egyenletet írhatjuk fel:

$$\text{Oszlop – viasszanyerési hatásfok (\%)} = \frac{D}{B} \times 100$$

Amennyiben  $B = D$  egyenlőség nem teljesül, az extraktumban található komponenseknek csak bizonyos hányadát sikerült meghatározunk. Tehát csak abban az esetben számíthatjuk ki a kromatográfiásan meghatározott módosulatok összegéből az extrakciós hatásfokot, amennyiben az az extraktum teljes arzéntartalmával megegyezik. Ellenkező esetben az extrakciós hatásfok az alábbi egyenlettel írható fel:

$$\text{Extrakciós hatásfok}^* (\%) = \frac{B}{A} \times 100$$

Az extrakciós hatásfokból és az oszlopviasszanyerési hatásfokból kiszámítható, hogy a módosulatanalitikai vizsgálatok során a minta teljes arzéntartalmának ténylegesen hány százalékát sikerült meghatározunk:

$$\text{Meghatározott arzénkomponensek aránya a mintában (\%)} = \frac{D}{A} \times 100$$

\* Az 'extrakciós hatásfok' kifejezést a dolgozatban több helyen a 'kinyerési hatásfok' kifejezéssel helyettesítem a szóismétlések elkerülése végett.

## **2.7 Arzénspeciáció vízi környezetekben**

A tengerek és óceánok átlagos arzéntartalma általában 1-5 µg/L között váltakozik. Hasonló arzéntartalom jellemzi a nem szennyezett, természetes tavakat és folyókat is. Az arzénmódosulatok eloszlására jellemző a szervesetlen módosulatok dominanciája, melyek a redox viszonyoktól függően arzenit és arzenát formájában vannak jelen. Emellett néhány esetben egyszeresen ( $\text{MA}^{\text{V}}$ ) és kétszeresen ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) metilezett formákat is találtak (SMEDLEY, 2002). A különféle szervezetek akkumuláló képessége miatt az arzénspeciáció tárgyát képező minták legnagyobb hányada vízi környezetből származik. A vizsgálatok jelentősége kettős. Egyrészt a bioindikátor szervezetek vizsgálata választ adhat a környezetet ért ökológiai hatásokról. Másrészt a táplálékként szolgáló élőlények fogyasztásából eredő arzénkitettség is meghatározható az arzénkomponensek vizsgálatával. A következő fejezetekben a tengeri és édesvízi élőlények arzénspeciációs vizsgálatának eddigi eredményeit foglalom össze.

### **2.7.1 Arzénspeciáció tengeri eredetű mintákban**

Az utóbbi évtizedekben végzett módosulatanalitikai vizsgálatok jelentős hányadát a tengeri élőlényekben található arzénvegyületek meghatározásával foglalkozó tanulmányok teszik ki. A tengeri élőlények arzéntartalma szárazanyagra vonatkoztatva átlagosan 20-30 mg/kg, néhány esetben azonban akár a 100 mg/kg-ot is meghaladhatja (CULLEN, 1989). Számos vizsgálat igazolja, hogy az akkumulálás mellett a tengeri szervezetek képesek a tengervízben található szervesetlen arzenitet ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) és arzenátot ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) szerves kötésű arzénmódosulatokká alakítani. A szervesetlen arzénvegyületek szerves, metilált formává alakításának mechanizmusa még tisztázatlan. Eddigi vizsgálatok feltételezik a tápláléklánc különböző élőlényeinek méregtelenítő szerepét. A lehetséges bioszintézis utak részletesebb tárgyalásáról egy korábbi doktori munkában olvashatunk (SÖRÖS, 2006). A tengeri élőlényekben leggyakrabban előforduló szerves arzénvegyületek az arzenobetain (AB), arzenokolin (AC), tetrametil-arzónium-kation (TETRA), trimetil-arzin-oxid (TMAO), metil-arzonát (MA), dimetil-arzinát (DMA). Módosulateloszlás szempontjából a tengeri eredetű minták két csoportra oszthatók. A tengeri algák esetében az arzén jelentős része különböző arzenocukor-módosulatok formájában van jelen. Algákból való izolálást követően szerkezetük azonosítását legelőször  $^1\text{H}$ -NMR és  $^{13}\text{C}$ -NMR spektroszkópiával végezték el (CULLEN, 1989), majd számos további kromatográfiás vizsgálatokkal igazolták jelenlétüket különböző tengeri algákban (MORITA, 1990). Az arzenocukrok eloszlása különbséget mutat az egyes algafajok között. Míg az oxo-szulfát- és oxo-szulfonát-arzenocukrok

a barna alga fajok fő arzénkomponensei, addig az oxo-glicerol és oxo-foszfát arzenocukrokat főként vörös és zöld algákban mutatták ki (FRANCESCONI, 1998). Az algák arzenocukrok mellett nyomokban tartalmazhatnak szervesetlen arzénkomponenseket és DMA-t is (HIRATA, 2005; TUKAI, 2002).

Az algákkal ellentétben a magasabb rendű tengeri élőlények domináns arzénmódosulata az arzenobetain. Ezen szervezetek arzénspeciációs térképe nagyjából egységes képet mutat. Az AB általában 80-90%-át teszi ki a teljes arzéntartalomnak. A maradék 10-20%-ot az egyéb, **1. ábrán** feltüntetett, többszörösen metilált arzénformák alkotják. Az algák által szintetizált arzenocukrok valamilyen méregtelenítési folyamat eredményei, melyek feltehetően az AB szintézisének kiinduló vegyületei (MAEDA, 1994). Ez magyarázatot adhat a tengeri élőlények magas AB koncentrációjára. Edmonds és kutatócsapata olyan növényevő állatokat vizsgáltak, melyek fő táplálékai az arzenocukorban gazdag algafajok. Kimutatták, hogy a természetes élőhelyükről gyűjtött garnélarákok és bolharákok a nagy AB tartalom (60%) mellett 1-2% arzenocukrokat is tartalmaztak. Ezzel szemben a steril laboratóriumi körülmények között nevelt és algával etetett rákok nem tartalmaznak AB-t, fő arzénmódosulataik a trimetil-arzin-oxid (TMAO) és az elfogyasztott algákban is megtalálható arzenocukrok voltak. Az egyik lehetséges magyarázat, hogy az AB szintézisében a táplálékkal együtt elfogyasztott mikroorganizmusoknak is szerepe van. Egy másik feltételezés szerint a TMAO az AB szintézisének prekursor vegyülete, a laboratóriumban nevelt élőlényeket pedig a szintézis korai szakaszában vizsgálták (EDMONDS, 1997). Larsen és munkatársai tengeri kagylók arzénmódosulatait vizsgálva arra a megállapításra jutottak, hogy ezek a szervezetek egyaránt tartalmazhatnak arzenocukrokat és arzenobetaint (LARSEN, 1997). Hasonló megállapításra jutott Li és csapata, akik az AB mellett jelentős mennyiségben találtak oxo-glicerol- és oxo-foszfát arzenocukrokat (LI, 2003). Az oxo-analógok mellett a kagylókban kisebb mennyiségben tio-arzenocukrokat is kimutattak. Ezen vegyületek csak az utóbbi években kerültek a figyelem középpontjába, miután tio-dimetil-arzinoil-acetátot találtak birkák vizeletében. A tio-analóg arzénvegyületek kialakulásának folyamata még nem ismert. Az oxo- és tio-analóg arzénkomponensek feltehetően párban vannak jelen a különböző szervezetekben, egymásba alakulhatnak, arányukat azonban a környezet nagy mértékben befolyásolhatja. Mivel Schmeisser és munkatársai tartósított kagylókban azonosítottak először tio-foszfát és tio-glicerol arzenocukrokat (SCHMEISSER, 2004), elképzelhető, hogy a tio-analógok mennyisége, melyek kén-tartalmú fehérjék mikrobiológiai bontásának eredményeként keletkezhetnek, az élőlények tárolásával növekszik. Ezt követően több hasonló tanulmány született, ahol tio-arzenocukrokat mutattak ki fésűs kagylóban (KAHN, 2005), algákban és óriáskagylóban (FRICKE, 2004; NISCHWITZ, 2006a). Tengeri gerincesek (halak és emlősök) esetében is számos arzénspeciációs vizsgálatot végeztek. A teljes arzéntartalom (1-10 mg/kg)

valamivel elmarad az algák és kagylók arzéntartalmához képest, az eredmények azonban egyhangúan bizonyítják az AB dominanciáját a mintákban. Li és munkatársai (LI, 2003) valamint McKiernan és kutatócsapata (MCKIERNAN, 1999) több, emberi fogyasztásra alkalmas halfajt (túhal, tonhal, lepényhal, lazac, tőkehal, szardínia) vizsgáltak és azt találták, hogy az AB a teljes arzéntartalomnak több, mint 95%-át teszi ki. Emellett nyomokban DMA-t és szervesetlen arzént detektáltak. Hasonló eredményt kaptak néhány tengeri emlős esetén, ahol a bálnák és fókák májában található arzénmódosulatókat vizsgálták (GOESSLER, 1998).

A tengeri szervezetekben található arzénkomponensek eloszlása, illetve a nem mérgező AB dominanciája egyértelműen jelzik, hogy ezen élőlények nagyobb mennyiségben való fogyasztása sem jár egészségkárosító hatással. A vizsgálatok eredményeként a halak arzéntartalmára előírt határértéket eltörölték. Az erre vonatkozó rendelet (Egészségügyi, Szociális és Családügyi Minisztérium 9/2003.(III.13.) ESZCSM rendelete) Magyarországon 2003-ban lépett hatályba.

### **2.7.2 Arzénspeciáció édesvízi eredetű mintákban**

Annak ellenére, hogy számos országban, köztük Magyarországon is a fogyasztott halak nagy része édesvízből származik, kevés adat áll rendelkezésünkre az édesvízi szervezetekben található arzénmódosulatókat illetően. Az arzén körforgása kapcsán Chen és Folt szennyezett édesvízi környezetet vizsgálva megállapították, hogy az arzén nem dúsul fel a tápláléklánc különböző lépcsőfokain (CHEN, 2000). A kis számú publikáció egyik fő oka, hogy az édesvízi élőlények kisebb arzéntartalma és annak alacsony kinyerési hatásfoka miatt a rendelkezésre álló vizsgálati módszerek nem voltak alkalmasak ezen szervezetek arzénmódosulatainak meghatározására. Néhány kivételtől eltekintve a tengeri szervezetek esetében bevált extrakciós módszerek hatásfoka édesvízi élőlények esetén, eddig még tisztázatlan okokból sokszor nem éri el a 40-50%-ot. Feltételezhető, hogy ezekben az esetekben az arzén olyan ismeretlen módosulatók formájában van jelen a mintában, mely erősen kötődik a mátrixhoz, ezért a hagyományos módszerekkel nem kivonható. Másfelől számíthatunk arra is, hogy a minták magas zsírtartalma tartja oldva az esetlegesen lipofil arzénmódosulatókat. Az édesvízi algák és kagylók esetében alig néhány publikáció található a nemzetközi irodalomban, a vizsgálatok főként különböző halfajokra terjednek ki, melyek teljes arzéntartalma 40-1000 µg/kg között változik (AL RMALLI, 2005; SCHOOF, 1999).

Tengeri fajtársaiktól eltérően az édesvízi algák kevesebb arzént képesek akkumulálni (3 mg/kg), továbbá speciesz összetételükben is különböznek. Az édesvízi algákon végzett első tanulmány Lai és munkatársai nevéhez fűződik, akik 93%-ban oxo-arzenocukor-glicerolt

detektáltak a mintában (LAI, 1997). Koch és munkatársai által vizsgált zöld algák nyomokban ugyan, de tartalmazznak oxo-arzenocukor-glicerolt, azonban a domináns módosulat a szervesetlen arzenát volt (KOCH, 1999).

A kagylók esetében valamelyest egységesebb az arzénspeciációs kép, mely szerint az édesvízi kagylókban a fő arzénkomponensek az oxo-arzenocukrok. Továbbá ellentétben a tengeri fajokkal az AB aránya a mintákban 1-2% közötti (KOCH, 1999; SOEROES, 2005b). Az oxo-arzenocukrok mellett Soeroes és munkatársai tio-módosulatokat is azonosítottak öt dunai kagyló fajban, melyek a kinyerhető arzéntartalom 30%-át tették ki. Az előző fejezetben említett Schmeisser és munkatársai által vizsgált tengeri kagylókhoz hasonlóan a dunai kagylók is több évig tárolt minták voltak, mely alátámasztani látszik azt a megállapítást, hogy a tio-arzénmódosulatok a tárolás során mikrobiológiai tevékenységek eredményeként alakulnak ki.

Az édesvízi halak arzénmódosulat-mintázatát tekintve közel sem annyira egységes, mint a tengeri szervezetek esetén. A vizsgálatok kis száma miatt az irodalmi adatokat összehasonlítva ellentmondásokba ütközünk. Tenyésztett édesvízi halak vizsgálata során kimutatták, hogy magas kinyerési hatásfok mellett a teljes arzéntartalom jelentős hányadát az AB tette ki (SHIOMI, 1995; SOEROES, 2005a), melynek magas koncentrációja azonban mindkét esetben az etetéshez használt haltáp AB tartalmából ered. Slejkovec és munkatársai befogott édesvízi halakat vizsgálva megállapították, hogy a kinyert arzén legnagyobb hányada szintén AB. A kinyerési hatásfok azonban sok esetben 10% alatti volt, vagyis a halakban található arzén legnagyobb része feltehetően nem AB (SLEJKOVEC, 2004). Arzénnel szennyezett területről gyűjtött halakban szintén különböző arányban találtak dimetil- és trimetil-arzénkomponenseket, míg szervesetlen módosulatokat nem sikerült kimutatni a mintákból (KAISE, 1997). Zheng és Hintelmann négy édesvízi halat vizsgálva teljesen eltérő megállapításokra jutottak. A csukában található fő arzénmódosulat a DMA volt, míg a sügér és naphal mintákban egyaránt nagy mennyiségben volt jelen szervesetlen módosulat, illetve a négyszeresen metilált tetrametil-arzónium-kation (ZHENG, 2004). Érdekes eredményt tettek közzé Koch és munkatársai, akik nyomokban oxo-foszfát-arzenocukrot mutattak ki kanadai tavakból származó nyúlhalakban (KOCH, 2001). Az eredmény különlegessége, hogy eddig még senki nem detektált arzenocukor módosulatokat akár tengeri akár édesvízi halakban.

Az irodalomban található eredményekből látható, hogy az édesvízi élőlények esetében nem beszélhetünk AB dominanciáról, mivel az csak néhány százalékban van jelen, továbbá az alacsony kinyerési hatásfokok miatt a teljes specieszmintázat meghatározása sem lehetséges. Az eltérő, sokszor ellentétes eredmények adódhatnak a reprezentatív mintavétel hiányából, mivel sok esetben a következtetéseket csupán egy-egy halminta alapján vonták le. Ez felveti azt a kérdést, hogy vajon az édesvízi környezetben a tengeritől teljesen eltérő arzénakkumulálási és

lebontási folyamatok játszódnak-e le? Amennyiben a válasz igen, át kell gondolnunk, hogy valóban helyes-e a tengeri élőlények vizsgálati eredményei alapján az édesvízi halakra is eltörölni az arzénre vonatkozó határértékeket. A fentiek miatt a doktori munkám részeként édesvízi tápláléklánc különböző egyedeinek módosulatanalitikai vizsgálatát végeztem el.





### **3 CÉLKITŰZÉSEK**

Amint azt az irodalmi áttekintésben bemutattam, az arzén módosulatanalitikáját az utóbbi három évtizedben folyamatos fejlődés jellemezte, mely tendencia a jövőben csak növekedni fog. A módszerek kimutatási határa javul, megteremtve ezzel a lehetőséget a környezetben előforduló arzénmódosulatok bioszintézisének és lebontási folyamatainak megismerésére, valamint az újabb arzénmódosulatok azonosítására. Az újabb arzénkomponensek szelektív meghatározásához új elválasztástechnikai és detektálási módszerekre van szükség. Doktori munkám célkitűzései ezek alapján a következők:

- Kromatográfiás módszerek fejlesztése a környezetben előforduló arzénmódosulatok szelektív meghatározására, különös tekintettel az oxo- és tio-arzenocukor vegyületekre.
- Az elemszelektív detektálás mellett egyre nagyobb hangsúlyt kap az arzénkomponensek molekulaszzelektív meghatározása. Doktori munkám során célul tűztem ki egy olyan HPLC-ES-MS/MS kapcsolt technikán alapuló speciációs módszer fejlesztését és bevezetését az arzénmódosulat-analitikába, mely mennyiségi elemzés mellett szerkezeti információt is szolgáltat az arzénmódosulatokról.
- A kidolgozott módszerek alkalmazása környezeti minták vizsgálatára:
  - Tengeri kagylók, halak
  - Édesvízi tápláléklánc egyedei (algák, növények, szivacsok, kagylók, hüllők, halak)
- Arzénspeciációs vizsgálatok alapján az Égei-tenger térségéből származó, nagy arzéntartalmú „tenger gyümölcsei”-nek fogyasztásából eredő arzénkitettség kockázatának meghatározása.
- Édesvízi tápláléklánc egyedeinek arzénakkumuláló képességének meghatározása és a bennük található arzénmódosulatok eloszlásának feltérképezése. A specieszmintázat összehasonlítása a tengeri szervezetekével.
- Egy hiteles anyagminta (BCR-710) arzénkomponenseinek jellemzése. A CRM alkalmas lehet környezeti mintákban található és speciációs standardként nem validált arzénmódosulatok azonosítására.
- Rávilágítani a módosulatanalitikai mérések minőségbiztosításának fontosságára, annak hiányából eredően elkövethető hibákra. Alkalmazható megoldásokra tett javaslatok.



## 4 ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1 Vizsgálatok során alkalmazott vegyszerek, standard oldatok és referencia anyagok

Vizsgálataim során analitikai tisztaságú vegyszerekkel dolgoztam. Ioncserélt vízként minden esetben Elgacan Ultra-Pure patronnal (Elga Ltd., High Wycombe Bucks, Anglia)  $R < 10 \text{ M}\Omega$  ellenállásig tisztított vizet használtam.

A különböző pufferek készítéséhez használt  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  és  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  sókat,  $\text{NaOH}$ -ot, hangyasavat, sósavat, piridint, ammóniát, valamint a tio-arzenocukrok szintéziséhez használt  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -szulfidot a Reanal (Magyarország) cégtől szereztük be. A  $\text{NaBH}_4$  reagenst és a  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ -ot a Sigma-Aldrich (Németország) cég, a  $\text{HNO}_3$ -at, a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ot és a metanolt a Merck (Németország) cég gyártja.

Az arzenát törzsoldatot a Merck (Németország) cégtől vásároltuk, az  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{DMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{MA}^{\text{V}}$  oldatokat pedig a megfelelő sók ioncserélt vízben oldásával állítottuk elő.  $\text{As}_2\text{O}_3$ -ot a Reanaltól,  $\text{CH}_3\text{AsO}_3\text{Na} \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  vegyületet a Carlo Elba cégtől, a  $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na} \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ -t pedig a Sigma-Aldrich Kft-től (Németország) rendeltük. Az oxo-arzenocukor standardokat, az AC-t, AB-t, TMAP-t, TMAO-t és TETRA vegyületeket az Alkalmazott Kémia Tanszék Kevin A. Francesconi professzortól (Ausztria) ajándékba kapta, az osztrák laborban pedig szintézissel állították elő. A tio-arzenocukrokat a laborban szintetizáltam a következő módon: Egy folyadék-gáz szeparátorba szilárd  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{S}$ -ot helyeztem, majd egy perisztaltikus pumpával cseppenként sósavat adagoltam. A keletkezett  $\text{H}_2\text{S}$  gázt 15 percen át ioncserélt vízen buborékolttam keresztül. A kénnel telített ioncserélt vízből egy egységet adtam kilenc egység oxo-arzenocukor standardhoz. Az így szintetizált tio-arzenocukrok fagyasztoóban tárolva 3-4 napig stabilnak bizonyultak.

A mérések minőségbiztosításához DOLT-2 (tőkehal máj, National Research Council, Kanada), DORM-2 (Tőkehal izom, National Research Council, Kanada) és BCR-710 (osztriga szövet, MULSPOT projekt) hitelesített referencia anyagokat használtam.

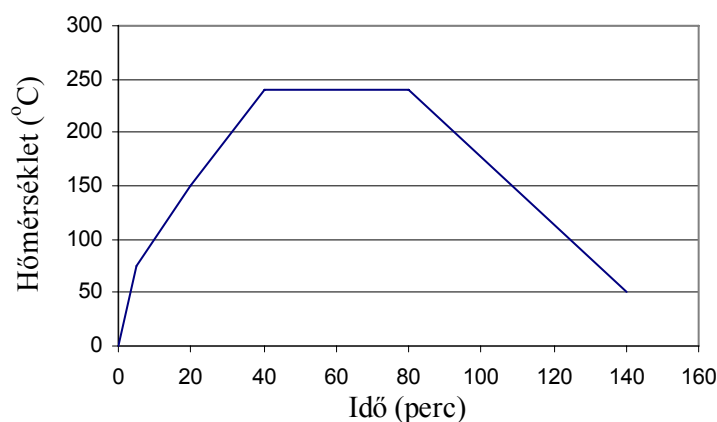
Doktori munkám során a szilárd mintákat minden esetben a mintavételt követően ioncserélt vízzel lemostam, szükség szerint apróbb részekre daraboltam, majd lefagyasztottam. A fagyasztott minták nedvességtartalmát Chris Alpha 1-4 (Christ, Németország) liofilező készülékkel eltávolítottam, majd a száraz mintát laboratóriumi darálóval (Fritsch 14.702, Németország) porítottam és homogenizáltam. A teljes arzéntartalom meghatározásához, illetve a módosulatanalitikai vizsgálatokhoz a homogén pormintákat használtam.

## 4.2 Teljes arzéntartalom meghatározásához végzett mintaelőkészítés

Teljes arzéntartalom meghatározásához nedves roncsolást alkalmaztam, melyet kétféle módon végeztem el.

Az egyik esetben alacsony nyomásállóságú (kb.: 2 bar) teflonbombákat használtam, melyekbe 0.2 g száraz pormintát mértem be 0.0001 g pontossággal. A bemérést követően a mintához 2-2 ml tömény salétromsavat és hidrogén-peroxidot adtam, majd 10-12 órát állni hagytam, hogy az oxidáció során keletkező gázok eltávozhassanak. Ezután a teflonbombákat légmentesen lezártam és laboratóriumi nyomástartó edényben 1 órán keresztül 110 °C-on tartottam őket, mely alatt a minta szervesanyag tartalma teljesen elroncsolódott. A bombák hűtését követően tartalmukat maradék nélkül 10 ml-es mérőlombikba mostam, majd ioncserélt vízzel jelre töltöttem. A mérést megelőzően a mintákat tízszeresére hígítottam, melyek salétromsavtartalma így 2% volt. Az extrakciót követően a felülúszó teljes arzéntartalmának meghatározásához szintén nedves roncsolással készítettem elő a mintákat. Ehhez a teflonbombákba 2 ml extraktumot mértem be, majd hozzáadtam 1-1 ml salétromsavat és hidrogén-peroxidot. Az előzőekhez hasonlóan elvégeztem a roncsolást, a mintát 5 ml-es mérőlombikba mostam, majd jelre töltöttem. A mérés előtt tízszeres hígítást alkalmaztam.

A másik roncsolási eljárás során viszonylag nagy nyomásállóságú (40 bar) mikrohullámú roncsoló berendezést (Milestone ultraCLAVE II feltáró, EMLS, Németország) alkalmaztam. A 12 ml-es kvarc csövekbe szintén 0.2 g száraz pormintát mértem be 0.0001 g pontossággal, majd a mintákhoz 4 ml koncentrált salétromsavat adtam. Az edényeket lezártam, a készülékbe helyeztem, majd a **4. ábrán** látható roncsolási programmal elvégeztem a teljes feltárást. Ezt követően a mintákat maradék nélkül mérőlombikba mostam és jelre töltöttem. Az extraktum esetében 2 ml szűrt mintát roncsoltam el 1 ml HNO<sub>3</sub>-val.



**4. ábra** Roncsolási program teljes As tartalom meghatározásához (ultraCLAVE II)

### 4.3 Teljes arzéntartalom meghatározására alkalmazott mérőrendszerek

Doktori munkám során a teljes arzéntartalom meghatározásához induktív csatolású plazma repülési idő tömegspektrométert (ICP-TOF-MS, Leco Renaissance, USA) és induktív csatolású plazma kvadrupól tömegspektrométert (ICP-Q-MS, Agilent 7500ce, Németország) használtam. Mindkét műszer esetében a 75-ös tömeg/töltés arány ( $^{75}\text{As}$ ) mellett a 77-es és a 82-es tömeg/töltés ( $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$  és  $^{82}\text{Se}$ ) arányt is monitoroztam az esetleges  $\text{ArCl}$  zavarások kiszűrése céljából. A mintát kézi (ICP-TOF-MS) vagy automata (ICP-Q-MS) adagolóval juttattam a porlasztóba. A készülékek beállításait a **2-3. táblázatok** tartalmazzák. Az adatok tájékoztató jellegűek, a készülék finomhangolásából eredően minden mérés alkalmával kisebb mértékben változtak.

#### 2. táblázat ICP-TOF-MS készülék működési paraméterei

<u>Műszer paraméterek</u>	
Frekvencia (MHz)	40.68
Kicsatolt teljesítmény (W)	1250
Porlasztó gáz (L/perc)	0.85
Iontükör feszültség, külső (V)	187
Iontükör feszültség, belső (V)	1514
Mintavételi mélység (mm)	5.8
Ion lencse 1 (V)	-536
Ion lencse 2 (V)	-490
Detektor (V)	-2150
Y eltérítés (V)	-1677
Einzel lencse 1 (V)	-1406
Einzel lencse 2 (V)	-1017
X eltérítés (V)	-1506
Integrációs idő (s)	3
Porlasztó típusa	Meinhard
Mintavevő kónusz	Nikkel, 1mm-es réssel
Skimmer	Nikkel, 0.4mm-es réssel

#### 3. táblázat ICP-Q-MS készülék működési paraméterei

<u>Műszer paraméterek</u>	
Kicsatolt plazma teljesítmény (W)	1500
Plazma gáz (L/perc)	14.6
Öblítő gáz (L/perc)	0.95
Porlasztó gáz (L/perc)	1.15
Mintavételi mélység (mm)	6
Extrakciós lencse 1,2 (V)	-150
Elektrosztatikus lencse 1,3 (V)	-150
Elektrosztatikus lencse 2 (V)	3
Porlasztó típusa	Babington típusú (V-porlasztó)
Ködkamra	2°C-ra hűtött
Mintavevő kónusz	Nikkel, 1mm-es réssel
Skimmer	Nikkel, 0.4mm-es réssel
Integrációs idő (másodperc)	0.9
Öblítési idő (másodperc)	60 másodperc, 2ml/perc
Stabilizációs idő (másodperc)	60 másodperc, 0.4ml/perc

#### 4.4 Arzénmódosulatok meghatározásához végzett mintaelőkészítés

Az arzénmódosulatok kinyeréséhez doktori munkám során különböző extrakciós módszereket alkalmaztam. Ehhez a szilárd pormintából 0.2-0.5 g mennyiséget mértem be 0.0001 g pontossággal, majd 5-10 ml extrahálószer (metanol, víz, vagy a kettő elegye) adagoltam. Az arzénkomponensek kinyerését a minta mechanikus rázatásával, melegítésével vagy ultrahanggal (Hielscher, Teltow, Németország) segítettem elő. Az extrakciót követően a mintákat 4500 ford./perc sebességgel 15 percig centrifugáltam (Hettich Zentrifugen, Németország), majd a felülúszót cserélhető membránlappal ellátott 0.45 µm pórusátmérőjű cellulóz fecskendőszűrővel (Millipore, Tullagreen, Írország) leszűrtem. A módosulatanalitikai vizsgálatokat a szűrt mintákon végeztem el.

#### 4.5 Arzénmódosulatok elválasztására alkalmazott módszerek

Az arzénmódosulatok elválasztására erős anioncserélő (Hamilton PRP-X100, Reno, USA) és erős kationcserélő (Zorbax 300-SCX, Agilent, Németország és Adsorbosphere SCX, Alltech, USA) kolonnákat alkalmaztam. Az oszlopok élettartamának megóvása érdekében minden esetben előtét kolonnát is használtam, mely ugyanazt a töltetet tartalmazta, mint az analitikai oszlop. A kromatográfiai módszerek paramétereit a **4-5. táblázatok** tartalmazzák. Egy oszlopon több módszert is alkalmaztam, mivel az elválasztástechnikai módszereket mindig az adott detektálási eljárásokhoz optimáltam. Részletes tárgyalásukra az eredmények részben térek ki.

#### 4. táblázat Munkám során alkalmazott anioncserés módszerek

Módszer		Anioncserés	
Csatolt rendszer	HPLC-ICPMS	HPLC-HG-AFS ; HPLC-ICPMS	HPLC-ESMS/MS
Oszlop	100 mm x 4.1 mm, 5µm	250 mm x 4.1 mm, 5µm	
Mozgó fázis	20 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	20 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20-100 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10-50% MeOH
pH	10.3	5.6	8.25
Idő	7 perc	25 perc; 18 perc	35 perc
Injektált mennyiség	20 µL	100 µl ; 20 µl	50 µL
Áramlás	1.5 ml/perc	1 ml/perc; 1.5 ml/perc	0.8 ml/perc
Elválasztott komponensek	tio-arzenocukrok	As <sup>III</sup> , As <sup>V</sup> , MA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup> , oxo-arzenocukrok	MA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup> , oxo- és tio-arzenocukrok

**5. táblázat** Munkám során alkalmazott kationcserés módszerek

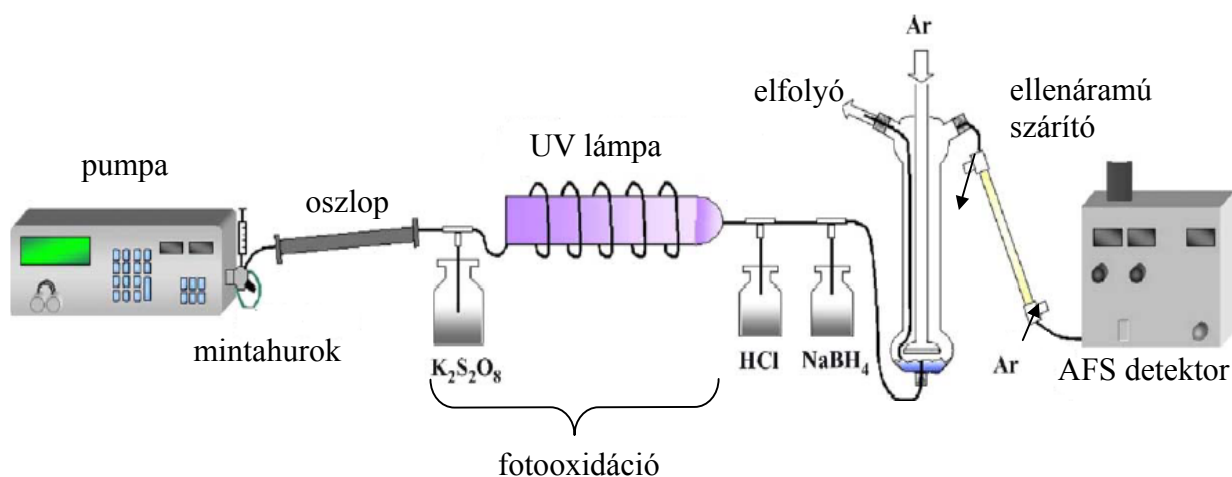
Módszer	Kationcserés		
Csatolt rendszer	HPLC-HG-AFS	HPLC-ICPMS	HPLC-ESMS/MS
Oszlop	Alltech Adsorbosphere 250 mm x 4.6 mm, 5µm	Agilent Zorbax 300-SCX 150 mm x 4.6 mm, 5µm	
Mozgó fázis	2.5 mM piridin-formiát	20 mM piridin-formiát	200 mM ammónium-formiát, 30% MeOH
pH	2.65	2.6	2.8
Idő	18 perc	6 perc	25 perc
Injektált mennyiség	100 µL	20 µl	50 µL
Áramlás	1 ml/perc	1.5 ml/perc	0.8 ml/perc
Elválasztott komponensek	AB, AC, TMAO, TETRA, oxo-arzenocukor-glicerol	AB, AC, TMAP, TMAO, TETRA, oxo-arzenocukor-glicerol	

**4.6 Arzénmódosulatok meghatározására alkalmazott kapcsolt analitikai rendszerek****4.6.1 HPLC-(UV)-HG-AFS kapcsolt rendszer**

A rendszer alapja a hidridfejlesztés, mely során a kromatográfián elválasztott arzénmódosulatokból hidridet képzünk. Az eluens állandó térfogatáramáért felelős négycsatornás Merck pumpát (Merck Hitachi L-7100, Tokió, Japán), a 100 µl űrtartalmú mintabevivő hurkot (loop-ot) tartalmazó hat kapus injektort (Rheodyne, Cotati, CA, USA) és az oszlopot nagy nyomásnak ellenálló fémcsövek kapcsolják sorba. A hidridfejlesztés savas közegben nátrium-tetrahidro-borát segítségével történik. A 0.7 m/v%-os NaOH tartalmú NaBH<sub>4</sub>-ot (1.5 m/v%) a sósavhoz (20 v/v%) hasonlóan egy többcsatornás perisztaltikus pumpa szállítja az oszlopból érkező mintához. A reakciópartnerek összekeverése egy poliéter-éter-keton (PEEK) anyagból készült reaktorban történik. A gázfejlődés már a reaktorban, illetve a tefloncsőben megindul, a reakció pillanatszerű. Mivel a hidridképzés exoterm folyamat, hatásfoka javul, ha egy 0 °C-os jeges vízen keresztül halad a mintaszállító cső. A hűtés másik előnye, hogy a vegyes halmazállapotú elegy gáz fázisából, a víz jelentős része kondenzál. A hűtést a folyadék és gáz fázis szétválasztása követi, amit egy folyadék-gáz szeparátor valósít meg. A szeparátorba érkező habszerű elegyen keresztáramban argon gázt vezetünk át, és a vízzár miatt a harmadik kivezetésen át távozik az Ar-AsH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub> gáz keverék. Az eltávozó gáz óhatatlanul magával visz kis

menyiségű vizet, ennek lángterhelő hatását kiküszöbölendő, gázszáritón vezetjük át a gázkeveréket. A szárító egy dupla falú „cső a csőben” szerkezet. A minta innen halad a lángba. A rendszer utolsó eleme a PSA 10,023-as AFS detektor (PSA Excalibur, PS Analytical, Sevenoaks, Kent, UK). Az atomizálást egy hidrogén-argon diffúziós, viszonylag hideg (800 °C) láng végzi, melyben nincs külön égési zóna, az atom képzése a láng teljes terjedelmében történik. A detektor egységben egy keskeny sáv szélességű interferenciaszűrő (200 nm-es átviteli maximummal), valamint egy fotoelektron-sokszorozó, fényforrásként pedig egy segédkisülésű As vájtkatód lámpa (BDHCS, Photron, Super Lamp, Victoria, Ausztrália) van elhelyezve.

A közvetlenül nem hidridképző arzénkomponensek detektálása csak előzetes UV-fotooxidációs lépés közbeiktatásával valósítható meg. A komponensek oxidálása céljából az elválasztást követően az efluenshez 6 m/v%-os  $K_2S_2O_8$  oldatot adagoltam, majd egy UV fénycső köré tekert, 0.8 mm belső átmérőjű PEEK csőbe vezettem. A hidridképző reagenseket ezután vezettem be a rendszerbe. A csatolt rendszer sematikus ábrája az **5. ábrán** látható.



**5. ábra** HPLC-(UV)-HG-AFS rendszer felépítése

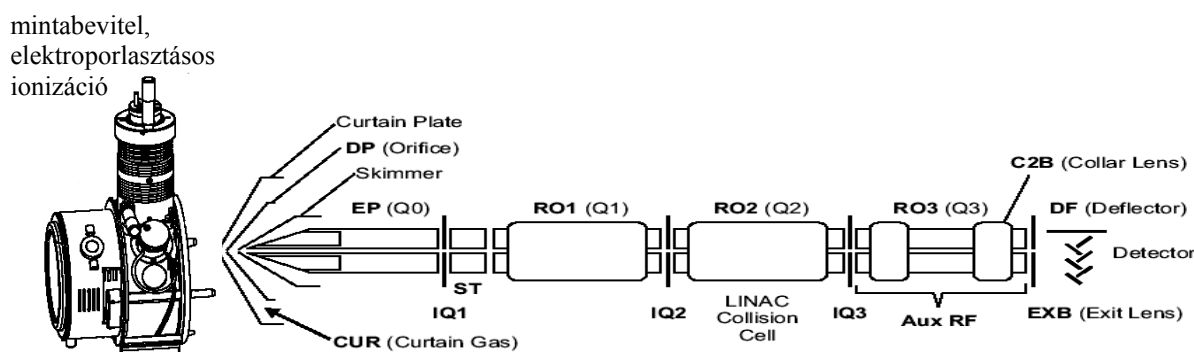


#### 4.6.2 HPLC-ICPMS kapcsolt rendszer

A komponensek folyadékkromatográfiás elválasztásához Agilent 1100 HPLC rendszert (Agilent, Németország) használtam, mely buborékmentesítő egységet, kétcsatornás pumpát, automata mintaadagolót és termosztáttal ellátott kolonnatartó részt tartalmazott. A kolonnát elhagyó folyadékáram egy PEEK kapillárison keresztül (0.125 mm belső átmérő) a Babington típusú (V-porlasztó) porlasztóba áramlik, a detektálást egy ütközési cellával ellátott ICP-Q-MS (7500ce Agilent, Waldbronn, Németország) elemszelektív detektor végzi. A 75-ös és a 77-es tömeg/töltés arányt tranziens módban monitoroztam. A felvett kromatogramokat a 'Chromatographic Data Analysis' (Agilent, Waldbronn, Németország) nevű szoftverrel értékeltem ki.

#### 4.6.3 HPLC-ESMS/MS kapcsolt rendszer

A komponensek elválasztását a 4.6.1-es fejezetben tárgyalt nagyhatékonyságú kromatográfiás rendszer végezte. A kolonnát elhagyó folyadékáramot egy PEEK kapillárison keresztül (0.125mm belső átmérő) egy 3200 Q TRAP elektroporlasztós tandem tömegspektrométerbe (Applied Biosystem: Applera, Magyarország) vezettem. A minta ionizálásához TurboIonSpray<sup>®</sup> ionforrást alkalmaztam, a porlasztás nitrogéngáz segítségével történt. Az ESMS/MS készülék sematikus rajza a **6. ábrán** látható. A készülék három kvadrupólt tartalmazott, ahol a második (Q2) egy nitrogéngázzal működő ütközési cella, a harmadik (Q3) pedig egy lineáris ioncsapda volt. Az IQ1-IQ3 a kvadrupólok között elhelyezkedő ionlencsét mutatja.



**6. ábra** Az ESMS/MS vázlatos felépítése

A készüléket három módban használtam:

**Q1 mód:** Ebben a módban csak az első kvadrupólt használjuk az ionforrásban keletkezett molekulaionok pásztázására, mellyel meghatározható a kérdéses molekula tömege. Ez pozitív módban  $[M+H]^+$ , negatív módban  $[M-H]^-$  tömeget jelent.

**Enhanced Product Ion (EPI) mód:** Ebben az esetben mindhárom kvadrupólt használjuk. A Q1 szolgál az ismert komponens (anyaion) kiválasztására. Kizárólag ez a komponens jut tovább a Q2-be, ahol az anyaion nitrogénnel ütköztetve fragmentálódik. A keletkezett fragmensekről (leányionokról) Q3 segítségével felvesszük a tömegspektrumot. A vegyületek egyedi tömegspektruma kiválóan alkalmas a molekulák jellemzésére.

**Multiple Reaction Monitoring (MRM) mód:** Ebben az esetben szintén mindhárom kvadrupólt használjuk azzal a különbséggel, hogy a Q3 nem a fragmensek pásztázására szolgál, hanem egy bizonyos fragmensionnt szűrünk ki vele és juttatjuk a detektorba. Az MRM mód - vagyis amikor egy anyaiont és annak egy bizonyos fragmensét monitorozzuk - alkalmas mennyiségi meghatározás céljára, nagy szelektivitásának köszönhetően alacsony kimutatási határ (ppt nagyságrend) érhető el vele.

## 5 EREDMÉNYEK

### 5.1 Elválasztástechnikai módszerek fejlesztése

Doktori munkám során elválasztástechnikai módszereket fejlesztettem tovább, illetve új módszereket dolgoztam ki az arzénmódosulatok szelektív elválasztására. A módszerek továbbfejlesztését az eddig nem vizsgált arzénmódosulatok rutinszerű vizsgálata követelte meg, míg az új módszerek kidolgozását az arzénspeciációba bevezetett korszerűbb detektorok tették szükségessé.

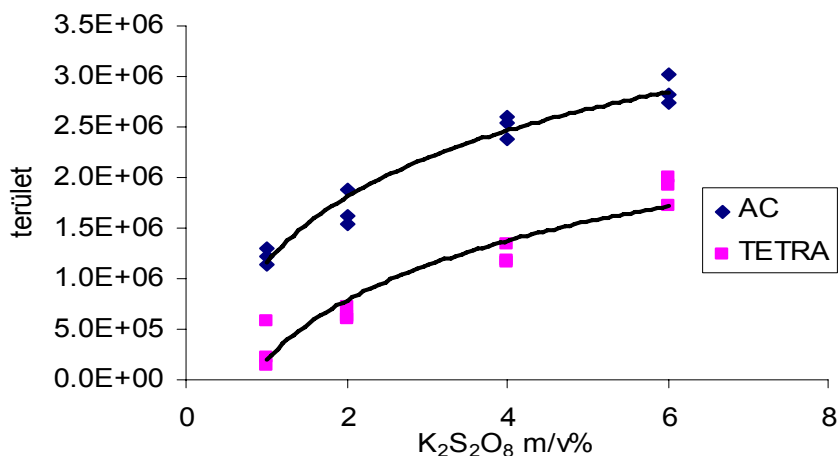
#### 5.1.1 Arzénmódosulatok meghatározása HPLC-(UV)-HG-AFS csatolt rendszerrel

Az Alkalmazott Kémia Tanszéken korábban kidolgozott elválasztástechnikai módszerek az anionos  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$ ,  $\text{MA}^{\text{V}}$  és  $\text{DMA}^{\text{V}}$  és a kationos AB és AC meghatározására korlátozódtak. Az anionos komponensek hidridképzéses vizsgálatához szükséges paramétereket Mester és Fodor korábban már optimálták (MESTER, 1996). A nem hidridképző kationos komponensek esetében a mintát ultrahangos porlasztással juttatták az AFS mérőrendszerbe (MESTER, 1997). A hidridképzéses mintabevitelen alapuló módszerfejlesztés során kibővítettem a meghatározható arzénkomponensek körét az oxo-arzenocukor módosulatokra és a kationos komponensekre.

##### 5.1.1.1 Kationos arzénkomponensek elválasztásának kidolgozása

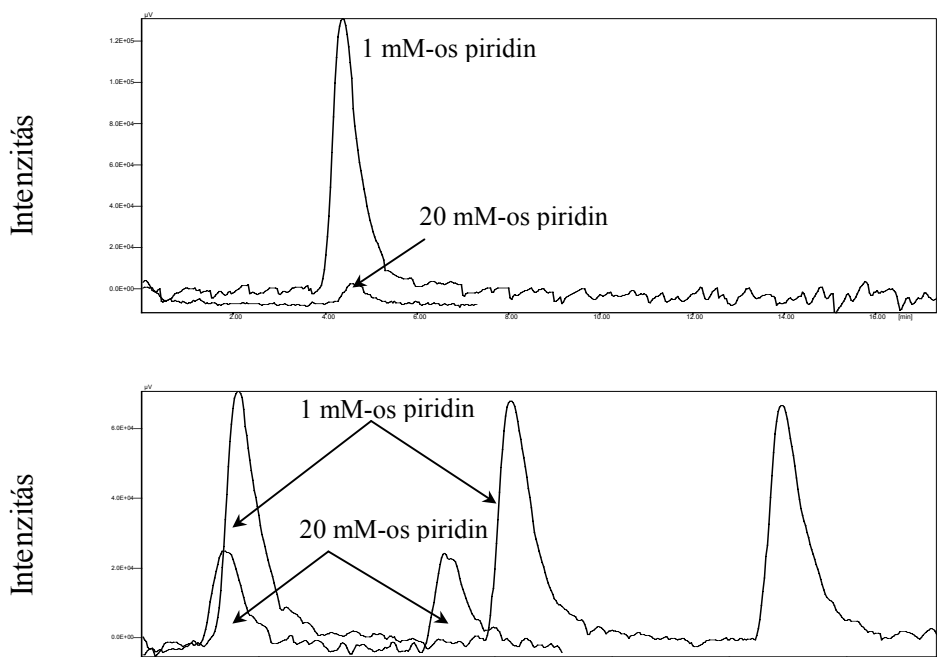
Az irodalmi áttekintésben már említésre került, hogy a kationos arzénkomponensek előzetes oxidációs lépés közbeiktatása nélkül nem képesek arzén-hidrid kialakítására (2.6.3.1. fejezet), ezért először a hidridképzést megelőzően egy fotooxidációs lépést iktattam a rendszerbe (**5. ábra, 4.6.1.**). Megvizsgáltam a komponensek hidridképzési hatásfokát a hozzáadott  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  függvényében, ahol az oxidáló reagens koncentrációját 1-6 m/v% között változtattam (**7. ábra**).

Mindegyik komponens esetében - beleértve az arzenocukrokat is - arra a következtetésre jutottam, hogy a  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  oldat koncentrációjának növelésével a hidridképzés hatásfoka is javul, azonban a nagyobb koncentráció alkalmazhatóságának határt szabott a  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  oldhatósága. Ezek alapján a továbbiakban 6 m/v%-os  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  oldatot használtam.



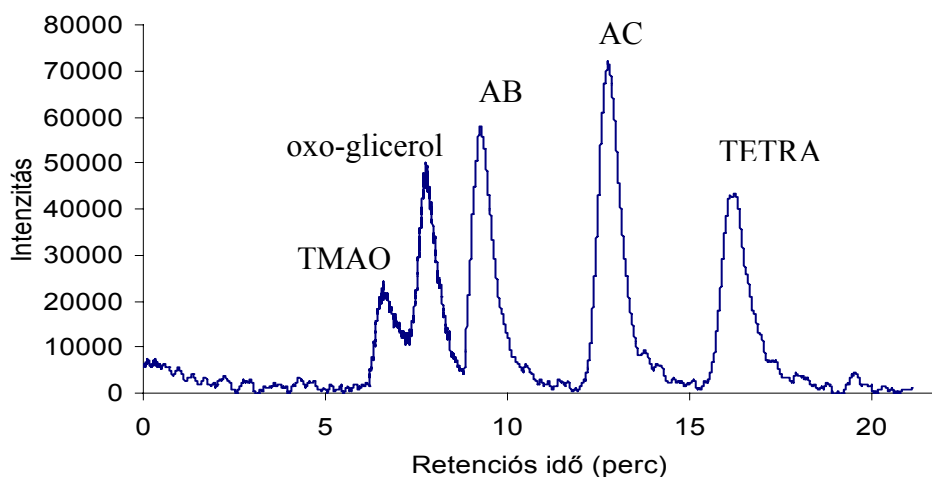
**7. ábra** A hidridképzési hatásfok alakulása a K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> koncentrációjának függvényében

A komponensek elválasztásához szilikagél alapú erős kationcserélő oszlopot alkalmaztam (Alltech, Adsorbosphere). Az elválasztás hatékonysága függ a molekula ionizáltságától, mely a pH változtatásával befolyásolható. Az **1. táblázatból** látható, hogy a TMAO pH=3.6 alatt kation, tehát a mozgófázis pH-ját lehetőleg ezen érték alatt kell tartani. Az AB pH=2.2 alatt kation, felette pedig ikerionos szerkezetű, azonban az alkalmazható savas pH-nak határt szab az oszlop pH-tűrése. A TETRA és az AC állandó kationok, ionos állapotuk a pH változtatásával nem befolyásolható. A fentiek alapján tehát olyan puffert kell választani, mely pH=2 és pH=3 közötti tartományban alkalmazható. Az irodalmi adatokat alapul véve mozgó fázisként piridint alkalmaztam, az optimálás során a különböző pH-t hangyasavval állítottam be. Egy másik fontos paraméter a puffer koncentrációja. Az elválasztás optimálását megelőzően megvizsgáltam, hogy a piridin milyen módon befolyásolja az egyes komponensek detektálhatóságát. A vizsgálat során az egyes arzénkomponenseket kromatográfiás oszlop nélkül, úgynevezett 'flow injection' módban mértem, az eluens összetételét változtatva. A **8. ábrán** példaként az AB és az AC jelintenzitását mutatom be a piridin koncentrációjának függvényében, ahol látható, hogy az 1 mM-os piridin-formiáthoz képest a 20 mM-os piridin-formiát már jelentős jelcsökkenést idéz elő. Látható továbbá, hogy ez a hatása sokkal kifejezettebb az AB esetében. Elsődleges célom a komponensek megfelelő elválasztása volt, ezért a módszer kidolgozása során elsődlegesen ezt tartottam szem előtt, másrésről igyekeztem az elválasztást a lehető legalacsonyabb piridinkoncentráció mellett megvalósítani.



**8. ábra** 50 ng/ml AB (fent) és 50 ng/ml AC (lent) érzékenysége ‘flow injection’ módban, ha az eluens 1mM-os illetve 20 mM-os piridin-formiát (pH=2.5).

A pH-t (pH=2-3) és a puffer koncentrációját (1-100 mM) változtatva a leghatékonyabb elválasztást 2.65-ös pH és 2.5 mM-os piridin-formiát alkalmazása esetén értem el 1 ml/perces áramlási sebesség mellett. A kromatogram a **9. ábrán** látható. Az AB, AC, és TETRA komponensek jól elváltak, míg a TMAO és az oxo-glicerol módosulatok teljes elválasztása nem volt megoldható az adott oszlopon. Az egyes komponensekre a kimutatási határok 3-10 µg/l között váltakoztak 100 µl-es mintabeviteli hurok alkalmazása esetén. A legrosszabb kimutatási határt az oxo-glicerol (10 µg/l) és a négy metilcsoportja miatt legkevésbé hidridaktív TETRA (6 µg/l) esetében tapasztaltam.



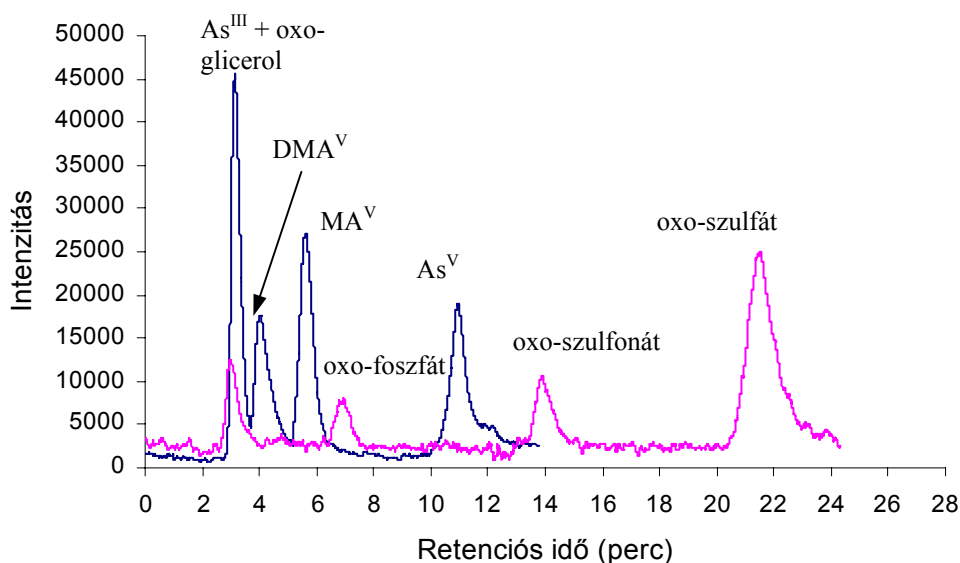
**9. ábra** Kationcserés elválasztás Alltech Adsorbosphere oszlopon (pH=2.65, 2.5 mM piridin-formiát, 1 ml/perc, 100µl injektált mintaoldat)

### 5.1.1.2 Anionos arzénkomponensek elválasztásának kidolgozása

A négy anionos komponens ( $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{DMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{MA}^{\text{V}}$ ,  $\text{As}^{\text{V}}$ ) elválasztása korábban fordított fázisú ionpárpépző kromatográfiával és ioncserés kromatográfiával valósult meg. Az ioncserén alapuló módszer egyik hátránya a gradiens elúció volt, mely az oszlop regenerálása következtében nagymértékben megnövelte a méréshez szükséges időt. A négy anionos komponens és az arzenocukrok elválasztásának kidolgozását a  $\text{pK}_a$  értékek és az eddigi tapasztalatok figyelembevételével végeztem el. Korábbi kísérletek alapján a komponensek elválasztására a legmegfelelőbbnek a  $\text{pH}=5-7$  tartomány bizonyult, így én is ebben a  $\text{pH}$  tartományban vizsgáltam a komponensek visszatartását. Az **1. táblázatból** látható, hogy a leggyengébb sav az arzénessav, mely  $\text{pH}>9$  esetén disszociál, ez alatt tehát nem várható visszatartás az anioncserés oszlopon. Az arzénsav  $\text{pH}=4$  esetén  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  formában, míg  $\text{pH}=5-8.5$  tartományban  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  és  $\text{HAsO}_4^{2-}$  formákban van jelen. A  $\text{MA}^{\text{V}}$  esetében  $\text{pH}=4$  körül a  $\text{CH}_3\text{AsO}_3\text{H}_2$  és a  $\text{CH}_3\text{AsO}_3\text{H}^-$  formák egyenlő arányban találhatók meg. A  $\text{pH}=5-7$  közötti tartományban a hidrogén-metil-arzonát a domináns. A  $\text{DMA}^{\text{V}}$   $\text{pK}_a$  értéke 6.2, ami azt jelenti, hogy ezen a  $\text{pH}$ -n a molekuláknak körülbelül fele deprotonált, a másik fele pedig protonált állapotban van. A fent említett  $\text{pH}$  tartományban ezért a  $\text{DMA}^{\text{V}}$  kismértékű visszatartására lehet számítani.

A dimetil-arzenocukor módosulatok savas vagy bázikus tulajdonsággal rendelkeznek a ribózhhoz kapcsolódó aglikon résztől függően. A semleges aglikont ( $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$ ) tartalmazó oxo-arzenocukor-glicerol esetén a dimetil-arzin-oxid rész savas közegben ( $\text{pH}<3$ ) protonálódhat. Magasabb  $\text{pH}$ -n az oxo-glicerol azonban semleges, ezért az anioncserélő oszlopon nincs visszatartása, meghatározása kationcserés kromatográfiával történik (5.1.1.1 fejezet). Az oxo-arzenocukor-foszfát, -szulfonát és -szulfát esetében nem találtam irodalmi hivatkozást a disszociációs állandó meghatározására. A dibutil-foszfát  $\text{pK}_a=1.0$  értékét figyelembe véve feltehetően az egy savas protont tartalmazó oxo-arzenocukor-foszfát a vizsgált  $\text{pH}$  tartományban egyszerűen negatív töltésű lesz, tehát visszatartható az anioncserés oszlopon. Hasonlóan az alkán-szulfonsavakhoz ( $\text{R}-\text{SO}_3\text{H}$ ), melyek  $\text{pK}_a$  értékei rendre 1.92 ( $\text{R} = \text{CH}_3$ ), 1.68 ( $\text{R} = \text{C}_2\text{H}_5$ ), 1.53 ( $\text{R} = \text{C}_3\text{H}_7$ ), az oxo-arzenocukor-szulfonát és -szulfát  $\text{pH}=5-7$  körül szintén deprotonált állapotban van jelen az oldatban. A megfelelő  $\text{pH}$  beállításához ammónium-dihidrogén-foszfát puffert alkalmaztam. A  $\text{pH}$  és a puffer koncentrációjának (1-100 mM) változtatásával a **10. ábrán** látható izokratikus elválasztást valósítottam meg, ahol az eluens  $\text{pH}$ -ja 5.6, optimális koncentrációja 20 mM volt. Az áramlási sebesség 1 ml/perc, az injektált térfogat 100  $\mu\text{l}$  volt. A kimutatási határok az arzenocukrok esetén 5-10 ng/ml között váltakoztak, míg a többi anionos arzénmódosulatra 1-5 ng/ml között ingadozott. A módszer hátránya, hogy a kationos arzénkomponensek és az oxo-arzenocukor-glicerol az arzenithez hasonlóan a fronttal

eluálódnak, ezért a kationos komponensek jelenléte esetén az arzenit meghatározása az adott körülmények között nem lehetséges.



**10. ábra** Anioncserés elválasztás Hamilton PRP-X100 oszlopon (20 mM-os  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , pH 5.6, 1 ml/perc, 100  $\mu\text{l}$  injektált mintaoldat)

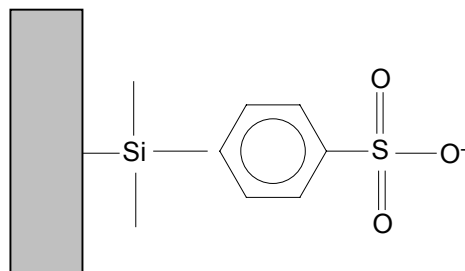
## 5.1.2 Arzénmódosulatok meghatározása HPLC-ICPMS csatolt rendszerrel

A HPLC-ICPMS legfőbb előnye - például a HG-AFS technikával szemben -, hogy a vizsgálandó oldatban található arzénkomponensek közvetlenül, előzetes derivatizációs lépés közbeiktatása nélkül meghatározhatóak. Az ICPMS alkalmazása mellett szól az is, hogy az elemspecifikus detektálásnak köszönhetően a detektor minden arzénkomponensre ugyanakkora válaszjelet ad, lehetőséget teremtve ezzel az ismeretlen arzénvegyületek mennyiségi meghatározására. Az elválasztástechnika bizonyos mértékben független ugyan az alkalmazott detektálási módtól, azonban a detektor előnyeit kihasználva érdemes az eddig alkalmazott kromatográfiás módszereket a jobb hatékonyság érdekében átgondolni és továbbfejleszteni. Ennek szellemében dolgoztam ki, illetve fejlesztettem tovább az alábbi elválasztástechnikai módszereket.

### 5.1.2.1 Kationos arzénkomponensek elválasztásának kidolgozása

A módosulatok elválasztásának optimálását az 5.1.1-es fejezetben tárgyalt szempontok alapján végeztem el. Az alkalmazott kromatográfiás oszlop ebben az esetben egy új, az Agilent

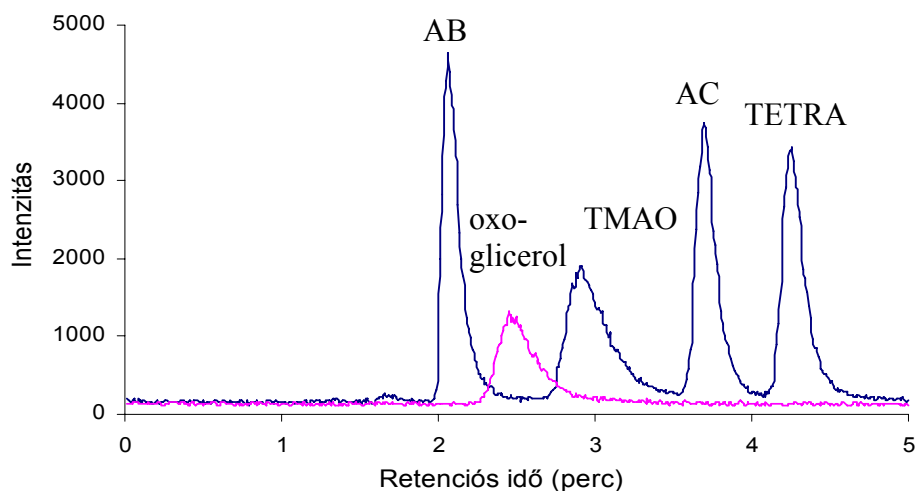
cég által kifejlesztett erős kationcserélő kolonna volt (Zorbax 300-SCX). Az Adsorbosphere oszlophoz hasonlóan az állófázis módosított szilikagél volt azzal a különbséggel, hogy a szulfonsavat egy aromás gyűrű segítségével kapcsolták a gélhez. Az eljárás előnye, hogy a térbeli elhelyezkedés miatt nagyobb lefedettség érhető el, csökkentve ezzel a vizsgálandó minta és az állófázis között kialakuló hidrogén hidas kölcsönhatások befolyását a komponensek elúciójára. Ezáltal a kidolgozott módszer sokkal jobban tartható és reprodukálható. Az oszlop töltetének vázlatos rajza a **11. ábrán** látható.



**11. ábra** Az Agilent Zorbax 300-SCX erős kationcserélő oszlop töltetének vázlatos rajza

Az elválasztás kidolgozásához mozgó fázisként szintén piridin-formiátot alkalmaztam, melynek koncentrációját 1-100 mM között változtatva a **12. ábrán** látható izokratikus elválasztást valósítottam meg. Összehasonlítva a HPLC-HG-AFS rendszerrel használt Adsorbosphere oszloppal, ebben az esetben a komponensek elválasztása kevesebb, mint öt perc alatt történt. Az elúciós idő ilyen mértékű csökkenthetősége és a komponensek szelektív elválasztásának megvalósíthatósága az eluálódó komponensek félértékszélességének csökkenésével magyarázható, melynek több oka is lehet. Egyrészt az állófázis összetételéből eredően a másodlagos kölcsönhatások szerepe elhanyagolható, csökkentve ezzel a vizsgált arzénvegyületek kenődését az oszlopon. Feltételezhetően ezeknek a hatásoknak tulajdonítható a két oszlop esetén, az elúció sorrendjében tapasztalt eltérés is. Továbbá az analitikai oszlopot és a detektort összekötő kapilláris csövek hossza a hidridképzéses technikához képest minimális, mely az áramlási sebesség növelésével és az injektált mintamennyiség csökkentésével együtt szintén csökkenti a diffúzióból eredő csúcsszélesedést. A kimutatási határ AB, AC és TETRA esetén 0.5 ng/ml, míg oxo-arzenocukor-glicerol és TMAO esetén 1 ng/ml volt. Annak ellenére, hogy az ICPMS érzékenysége minden arzénkomponensre azonos, a kromatográfia miatt az egyes módosulatokhoz tartozó csúcsok magassága és ezzel együtt félértékszélessége eltérő lehet, mely különböző kimutatási határokat eredményez. Ezt a **12. ábra** is jól szemlélteti, ahol az oxo-glicerol kivételével a többi komponens 10 ng/ml koncentrációjú.

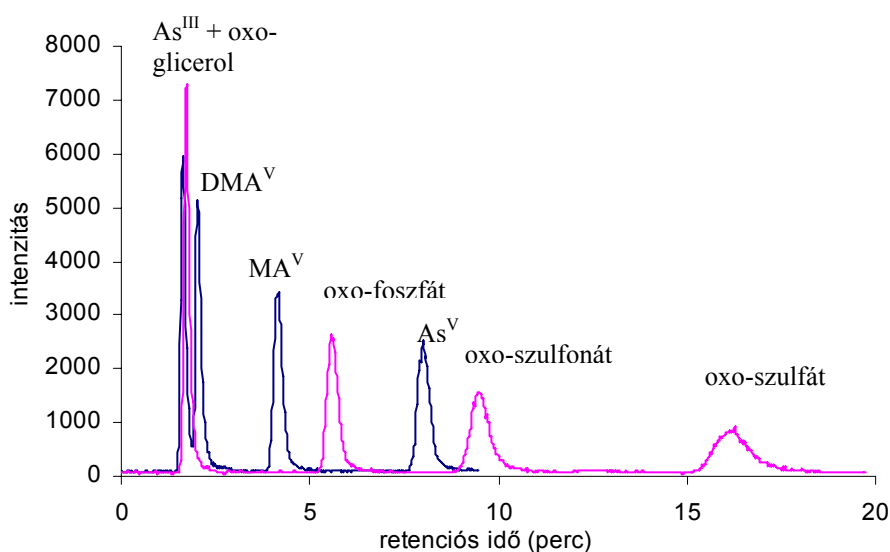




**12. ábra** Kationcserés elválasztás Agilent Zorbax 300-SCX erős kationcserélő oszlopon (pH 2.6, 20 mM-os piridin-formiát, 1.5 ml/perc, 20 µl injektált mintaoldat)

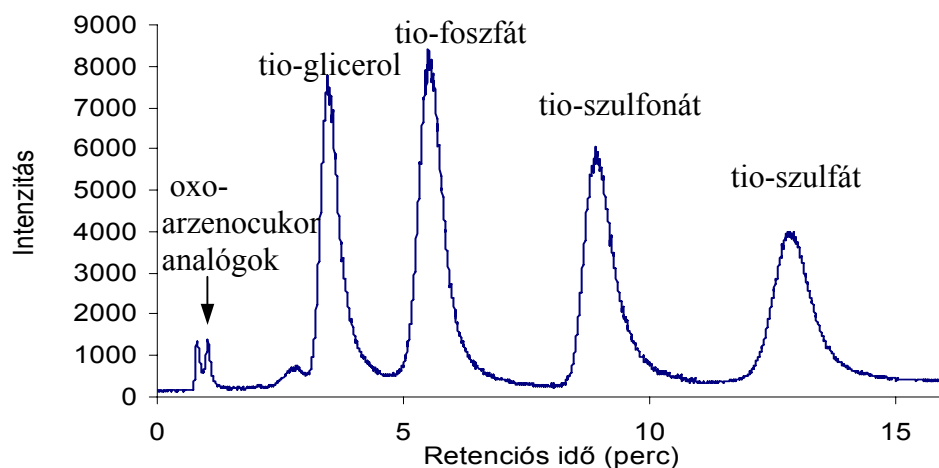
### 5.1.2.2 Anionos arzénkomponensek elválasztásának kidolgozása

A HPLC-ICPMS vizsgálatokhoz az 5.1.1.2-es fejezetben bemutatott elválasztástechnikai módszert alkalmaztam azzal a különbséggel, hogy a mozgófázis áramlási sebességét 1.5 ml/percre növeltem, az injektált mintaoldat mennyiségét pedig 20 µl-re csökkentettem. Az így kapott elválasztást a **13. ábra** szemlélteti. A kimutatási határok 0.5 ng/ml és 5 ng/ml között váltakoztak, mely különbség szintén a komponensekhez tartozó csúcsok eltérő félértékszélességéből következik.



**13. ábra** Anioncserés elválasztás Hamilton PRP-X100 oszlopon (20 mM-os  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , pH 5.6, 1.5 ml/perc, 20 µl injektált mintaoldat)

Miután 2004-ben tio-arzenocukrokat azonosítottak tengeri kagylók szöveteiből (SCHMEISSER, 2004), felmerült az igény egy olyan kromatográfiás technika iránt, mely alkalmas a négy tio-arzenocukor szelektív meghatározására. Az oxo-arzenocukrok esetében láthattuk, hogy az eltérő aglikon rész lehetőséget teremt a komponensek elválasztására anioncserélő oszlopon. Amint azt az **1. ábra** is mutatja, az oxo-cukrok és azok tio-analóg vegyületei azonos oldalláncokat tartalmaznak, az eltérés a ribóz ötös számú szénatomján található dimetil-arzénhez kettős kötéssel kapcsolódó oxigénben illetve kénben van. Ezek alapján feltételezhető, hogy a tio-arzén módosulatok a megfelelő elválasztástechnikai módszerrel egymás mellett szelektíven meghatározhatók. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a tio-arzén specieszeket anioncserélő oszlopon szokatlanul nagy retenciós idő jellemzi. A megnövekedett retenció feltehetően a komponensekben található As=S kötésből eredő apolárisabb jellegből adódik. Ezáltal a kéntartalmú arzenocukrok visszatartásában az ioncsere mellett a hidrofób kölcsönhatások is szerepet játszanak. Ezt a feltételezést támasztja alá a tio-arzenocukor-glicerol nagy retenciós ideje is, hiszen korábban már láttuk, hogy az azonos oldallánccal rendelkező oxo-arzenocukor-glicerol azonos körülmények között nem rendelkezik visszatartással az anioncserélő oszlopon. A mozgó fázis metanoltartalmának növelésével a retenciós idők tovább csökkenthetők. Az általam alkalmazott elválasztást a **14. ábra** szemlélteti, melyen látható, hogy a komponensek 15 perc alatt elválaszthatók egymástól. Az elválasztáshoz 20 mM-os  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  puffert használtam (pH 10.3) egy rövidebb (100 mm) Hamilton PRP-X100 anioncserélő oszlopon. Az eluens 3% metanolt tartalmazott. A többi komponens ebben az esetben a fronttal eluálódott.



**14. ábra** Tio-arzenocukrok elválasztása Hamilton PRP-X100 oszlopon (20 mM-os  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH=10.3, 1.5 ml/perc, 20  $\mu\text{l}$  injektált mintaoldat)

### 5.1.3 Arzénmódosulatok meghatározása HPLC-ESMS/MS csatolt rendszerrel

A standard oldatok hiánya és az elemspecifikus detektorok hiányosságai miatt az arzén módosulatanalitikája egyre inkább megköveteli az olyan detektálási módszerek alkalmazását, melyek lehetővé teszik a komponensek szerkezeti vizsgálatát és mennyiségi meghatározását egyaránt. Erre alkalmasak az úgynevezett lágy ionizációs technikák, ahol a molekulákat bomlás nélkül ionizáljuk, majd a tömegspektrométerbe juttatjuk. Doktori munkám egyik részeként egy új, HPLC-ESMS/MS csatolt rendszer alkalmazhatóságát vizsgáltam. Eltérően az eddig ismertetett kapcsolt technikáktól mind az elválasztás mind a detektálás terén kevés információ áll rendelkezésre az arzénkomponensek meghatározásához, rutinszerű alkalmazása egyenlőre még nem megoldott. Ezért ebben a fejezetben egyaránt részletesen kitérek a detektálási, elválasztástechnikai, valamint a mintatisztítási paraméterek optimalására és néhány validálási paraméter ismertetésére.

#### 5.1.3.1 Detektálási paraméterek optimalása

A detektálási paraméterek optimalása során két paraméter sereget különböztetünk meg. Egyrészt vannak az ionforrás paraméterek, melyek optimális értékei többek között az eluens összetételétől és áramlási sebességétől függően változnak. A változók másik csoportja a komponensfüggő paraméterek, melyek minden egyes meghatározandó vegyület esetében eltérőek, azokat minden molekulára külön optimalni kell. Az optimalandó paramétereket a **6. táblázatban** foglaltam össze. A komponensfüggő paraméterek mellett azok angol elnevezéseiből származtatott rövidítéseit is feltüntettem. Az optimalás során a mintabevitel minden esetben infúzióval történt, mely során a vizsgálandó molekulát tartalmazó standard oldatot kis áramlási sebességgel (5-25 µl/perc) folyamatosan juttattam be a tömegspektrométerbe, lehetőséget teremtve a paraméterek módosítása során a jelben bekövetkező változás folyamatos nyomon követésére.

**6. táblázat** Az optimalandó paraméterek az ESMS/MS esetén

Ionforrás paraméterek	Komponensfüggő paraméterek
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ionforrás feszültség (V)</li> <li>• függöny gáz (psi)</li> <li>• porlasztó gáz (psi)</li> <li>• szárító gáz (psi)</li> <li>• hőmérséklet (°C)</li> <li>• porlasztó tű pozíciója (mm)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• declustering potenciál - <b>DP</b> (V)</li> <li>• ütközési cella belépő potenciál - <b>CEP</b> (V)</li> <li>• ütközési energia - <b>CE</b> (eV)</li> <li>• ütközési cella kilépő potenciál - <b>CXP</b> (V)</li> <li>• belépő potenciál - <b>EP</b> (V)</li> </ul>

### 5.1.3.1.1 Ionforrás paraméterek

Először az ionforrás paraméterek optimalizálását végeztem el arzenobetainnal (modell oldat) Q1 módban. Irodalmi adatokra támaszkodva pozitív  $[M+H]^+$  ionizációt alkalmaztam. Mivel a módszerkidolgozás ezen korai szakaszában még nem állt rendelkezésemre elválasztástechnikai módszer, az optimalizáláshoz egy modell mozgófázist használtam (20% metanol, 1% HCOOH, 0.8 ml/perc), mely 1  $\mu\text{g/ml}$  AB-t tartalmazott. Az oldatot infúziós technikával juttattam a tömegspektrométerbe. A kromatográfiás módszer kidolgozását követően a paramétereket az optimált elválasztáshoz hangoltam. Az optimált ionforrás paramétereket a **7. táblázat** tartalmazza. A porlasztó gáz az apró folyadékcseppek kialakításában játszik szerepet, értéke nagymértékben befolyásolja az egyenletes és stabil permet létrehozását. A szárító gáz és a hőmérséklet egyaránt a keletkezett cseppek elpárologtatását segíti elő, optimalizálásuk során egy megfelelő kombináció elérésére kell törekednünk. A legjobb érzékenység abban az esetben érhető el, mikor a mozgófázis közel teljes mértékben elpárologtatható. A kismértékű porlasztás az érzékenység csökkenését, míg a magas gázáram és hőmérséklet a jel/zaj arány növekedését eredményezheti. A függöny gáz védelmi funkciót lát el, mely során az esetlegesen kialakuló nagyobb folyadékcseppek deklaszterizálásával megelőzi illetve minimális szintre csökkenti az ionoptika elszennyeződését. Az optimalizálás során azt a lehető legnagyobb értéket állítottam be, amely még nem okozott intenzitásvesztést.

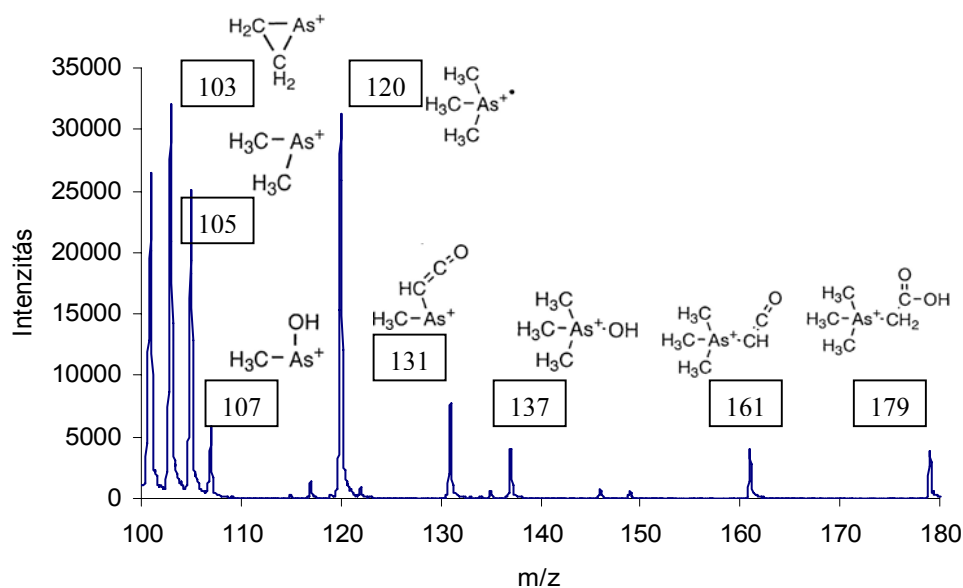
**7. táblázat** Optimált ionforrás paraméterek

Ionforrás paraméterek	Optimált érték
• ionforrás feszültség (V)	5500
• függöny gáz (psi)	45
• porlasztó gáz (psi)	50
• szárító gáz (psi)	45
• hőmérséklet ( $^{\circ}\text{C}$ )	550

### 5.1.3.1.2 Komponensfüggő paraméterek

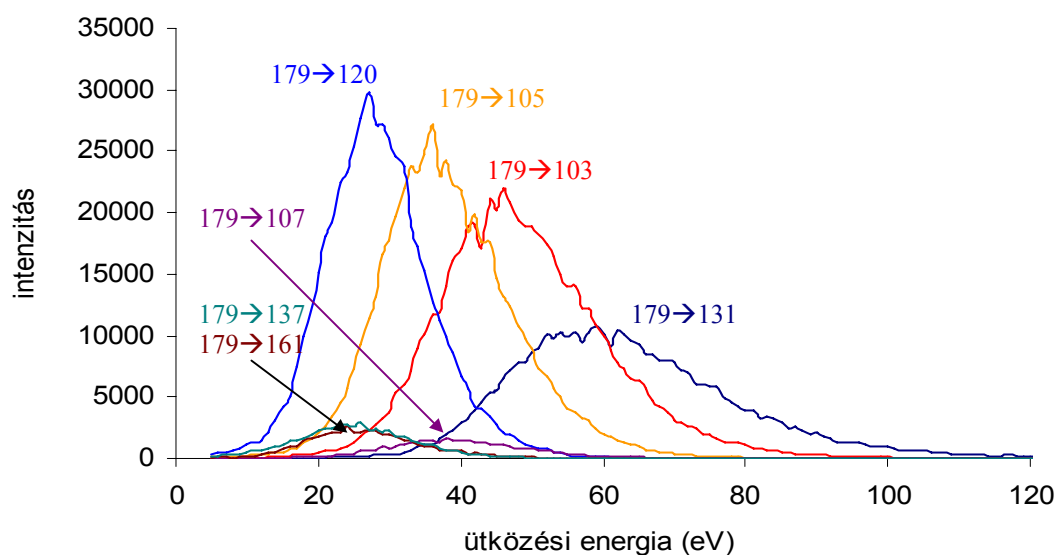
A komponensfüggő paraméterek optimalizálása során a készüléket EPI módban és MRM módban használtam. Első lépésként minden egyes arzénkomponensről meghatározott ütközési energia mellett felvettem egy EPI spektrumot, mely az anyaion fragmentációja során keletkezett termékionokat tartalmazza. Ezzel a módszerrel meghatároztam azoknak a fragmenseknek a csoportját, melyek megfelelő intenzitással keletkeznek és kiválóan jellemzik a kiindulási molekulát. Példaként a **15. ábrán** az AB EPI spektruma látható. Az ábrán a hét legintenzívebb és legjellemzőbb fragmension szerkezeti képletét is feltüntettem. Az AB fragmentálásához és a spektrum felvételéhez 35 eV ütközési energiát alkalmaztam. Ez az energia elegendő volt az AB

nagyobb mértékű hasításához, továbbá a kisebb energiát igénylő hasítások végtermékei mellett a kiindulási molekula is látható, teljes képet adva ezzel a lehetséges fragmensekről.



15. ábra Az arsenobetain EPI spektruma

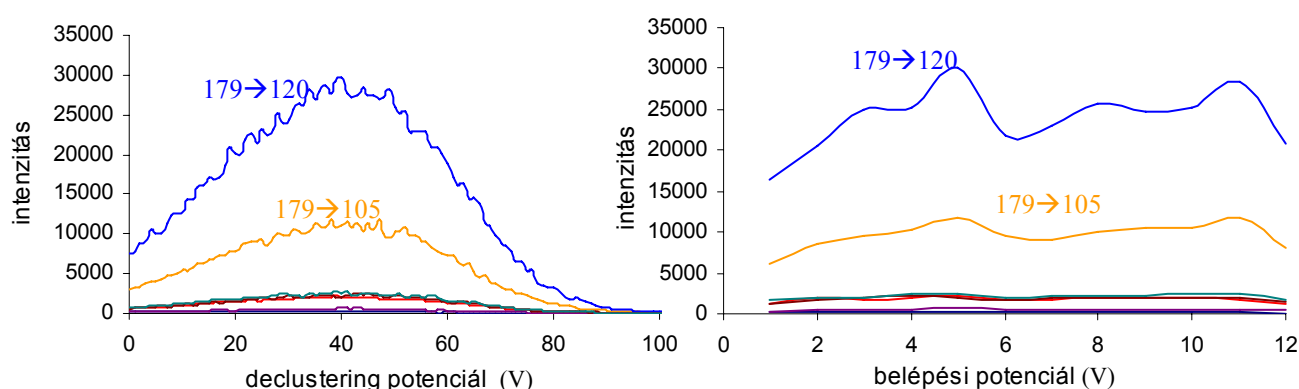
Az ütközési energiát változtatva a különböző fragmensek egymáshoz viszonyított aránya is változik. Mennyiségi vizsgálatok esetén az optimális ütközési energia az az energia, mellyel a kívánt fragmens intenzitása a legnagyobb. Ezért az optimalizálás során MRM módban minden egyes fragmensre adott válaszjelet megvizsgáltam az ütközési energia függvényében. Az ütközési energia optimalizálását a 16. ábra szemlélteti.



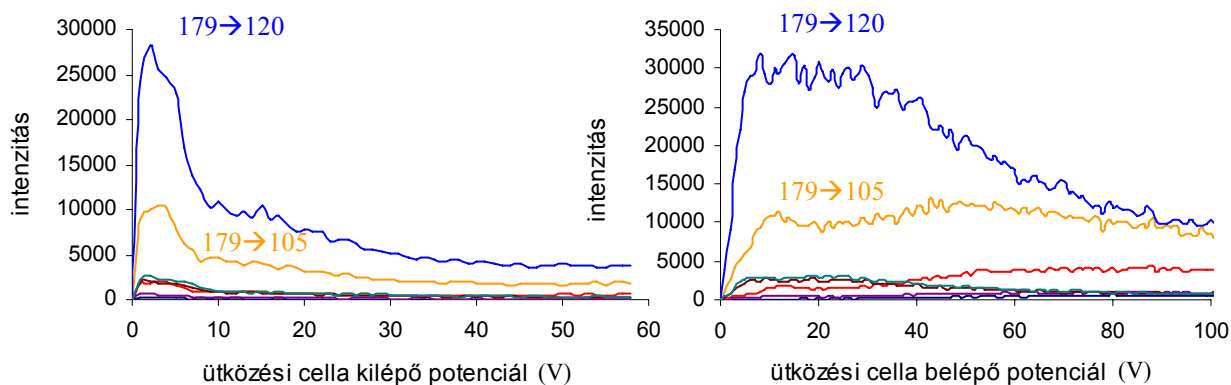
16. ábra Az arsenobetain fragmenseinek intenzitása az ütközési energia függvényében

A fenti ábrán látható, hogy az egyes fragmensek intenzitásának maximuma különböző ütközési energián van. Minden esetben az első szám az anyaiion tömege, a második pedig a

keletkezett fragmension tömege. A későbbiekben ezt a jelölést alkalmazom a többi arzénkomponens esetében is. A **16. ábra** alapján kiválasztottam a két legintenzívebb fragmenst, és a továbbiakban ezek monitorozásával végzem az AB detektálását. A **6. táblázatban** látható, hogy az ütközési energia mellett további négy optimálandó paraméter is szerepel. Ezeket az ütközési energiához hasonlóan minden egyes átmenetre optimáltam (**17-18. ábrák**). Látható, hogy míg a declustering potenciál esetében egy jól definiálható optimum görbét kapunk, addig a belépési potenciál esetében több optima is lehet a görbének. Az ütközési cella kilépő és belépő potenciál esetében szintén egyértelműen meghatározható az optimum érték. Ezekben az esetekben azonban az optimumtól való kisebb eltérés (főleg negatív irányba) is nagyobb mértékű intenzitáscsökkenést eredményezhet.



**17. ábra** Az AB átmeneteinek intenzitása a declustering és a belépési potenciál függvényében



**18. ábra** Az AB átmeneteinek intenzitása az ütközési cella kilépő és belépő potenciál függvényében

A fent bemutatott optimálási folyamatot minden egyes arzénkomponens esetében elvégeztem, majd az optimált paramétereket beállítva kiválasztottam a két legintenzívebb  $\text{anyaion} \rightarrow \text{fragmension}$  átmenetet. A két átmenet monitorozásának szükségszerűségére a későbbiekben még részletesen kitérek. Az optimált komponensfüggő paramétereket a **8. táblázatban** foglaltam össze. A táblázat és a fenti ábrák is azt mutatják, hogy az  $\text{anyaion}$

fragmentálódási képességét és a képződött fragmensek intenzitását legjobban az ütközési energia befolyásolja.

**8.táblázat** Komponensfüggő paraméterek ESMS/MS detektálás során

Módosulatok	Átmenetek	DP (eV)	CE (eV)	CEP (eV)	CXP (eV)	EP (eV)
DMA	139→91	31	30	31.9	2	4
	139→89	31	18	31.9	2.9	4
MA	141→123	31	17	31.9	2	4
	141→91	31	30	31.9	2	4
AB	179→120	39	27	15	4	4
	179→105	39	36	43	4	4
TMAP	193→120	43	32	10	4	4
	193→105	43	40	62	4	4
TMAO	137→107	39	30	10	4	4
	137→89	39	40	60	4	4
AC	165→121	35	25	21	4	4
	165→147	35	25	18	4	4
TETRA	135→120	38	24	15	4	4
	135→103	38	38	45	4	4
oxo-arzenocukor- glicerol	329→237	44	23	25	3.5	4
	329→195	44	32	12	3.5	4
oxo-arzenocukor- foszfát	483→237	49	38	41.8	3.5	4
	483→329	49	33	41.8	3.5	4
oxo-arzenocukor- szulfonát	393→97	58	29	39.3	3.5	4
	393→237	58	23	39.3	3.5	4
oxo-arzenocukor- szulfát	409→329	50	11	39.7	3.5	4
	409→97	50	30	39.7	3.5	4
tio-arzenocukor- glicerol	345→97	35	30	37.9	2	4
	345→253	35	16	37.9	3.5	4
tio-arzenocukor- foszfát	499→97	62	42	42.4	2	4
	499→253	62	26	42.4	4	4
tio-arzenocukor- szulfonát	409→97	35	30	39.7	2	4
	409→253	35	16	39.7	2.5	4
tio-arzenocukor- szulfát	425→97	35	30	40.2	2	4
	425→253	35	16	40.2	2.5	4

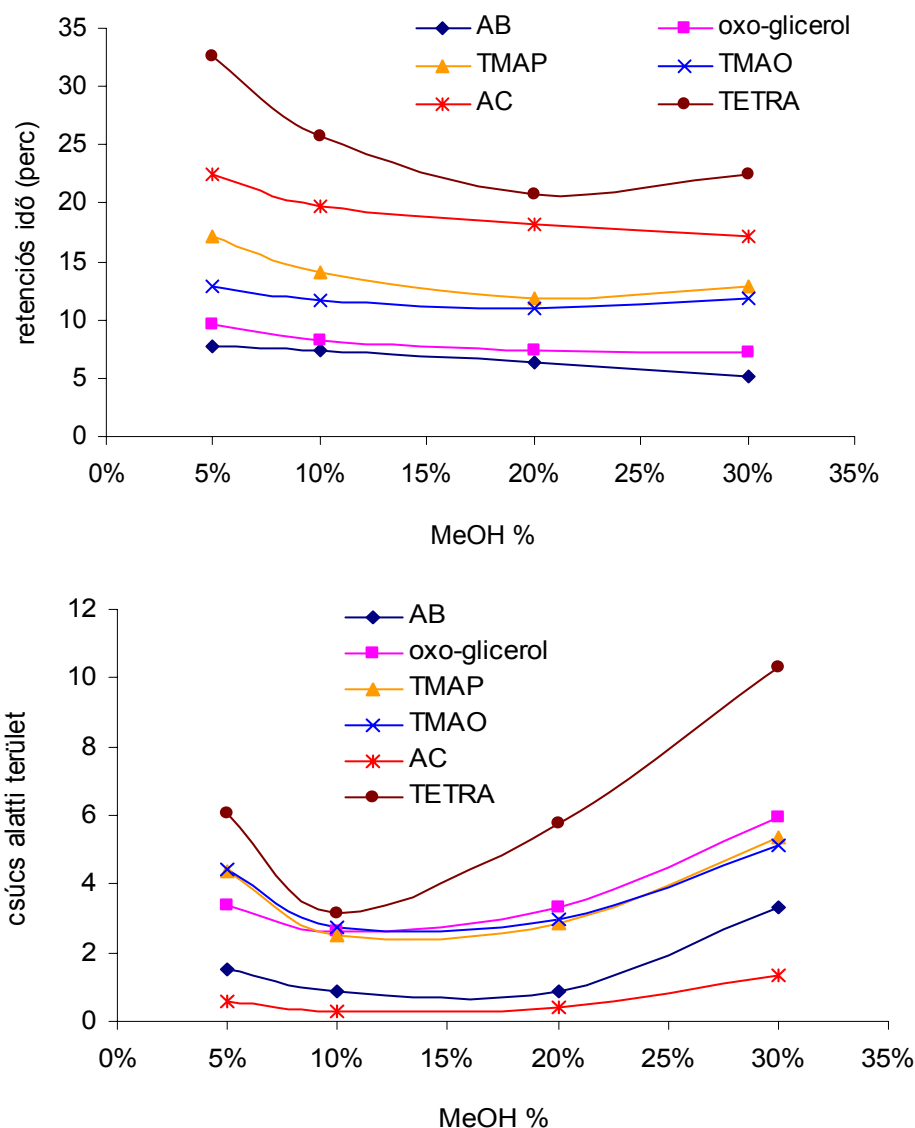
A várakozásoknak megfelelően a DP értéke módosulatonként különbözik, azonban az egy anyaionhoz tartozó fragmensionok esetében megegyezik. Ennek magyarázata, hogy a DP a skimmer és az orifice tányérok közötti (6. ábra) potenciálkülönbséget jelöli, melynek feladata az ionforrásban a vizsgálandó molekulához esetlegesen kötődő oldószer molekulák minimális szintre csökkentése. Túl nagy DP alkalmazása a vizsgálandó molekula ionforrásban történő hasadását eredményezheti, csökkentve ezzel a Q1-be jutó anyaionok számát. A CEP a Q0 és az IQ2 között fellépő potenciál különbség (6. ábra), mely a kívánt ion ütközési cellába való bejutását szabályozza. Az optimális CEP esetén az anyaion bejutásának hatásfoka a legnagyobb,

megnövelve ezzel a fragmentálható ionok mennyiségét. A CXP a keletkezett fragmensek gyorsítására szolgál a Q3-ba. Az optimális érték esetén a fragmensek a legjobb hatásfokkal érik el a Q3-at, majd a detektort. További munkámban a HPLC-ESMS/MS vizsgálatok során a **8. táblázatban** feltüntetett beállításokat alkalmaztam.

### **5.1.3.2 Kationos arzénkomponensek elválasztásának kidolgozása**

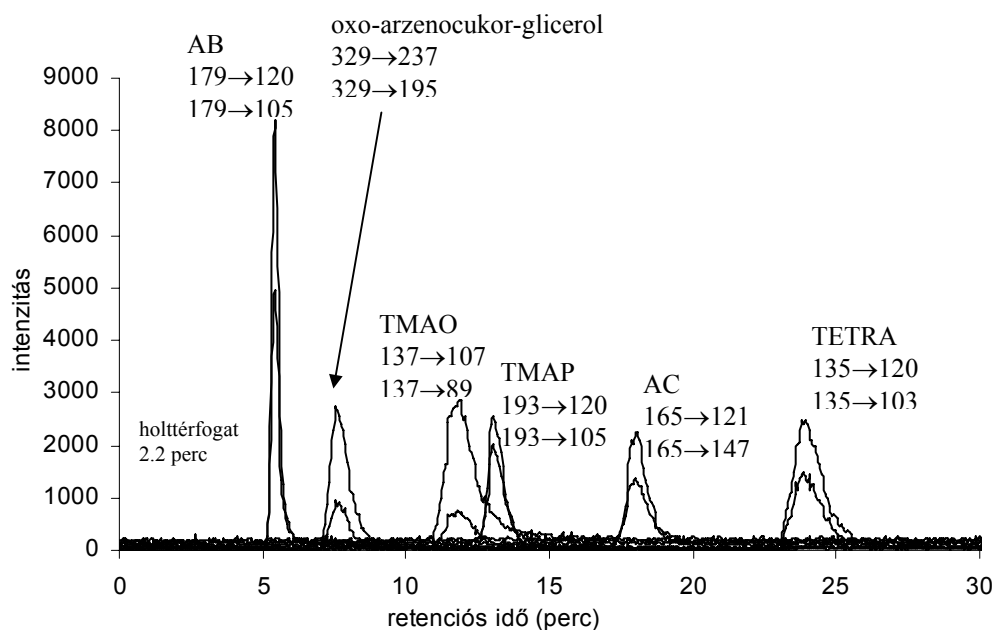
A detektálási paraméterek optimálását követően az arzénmódosulatok elválasztásának kidolgozását végeztem el. Az ES ionizáció sóérzékenysége miatt az AFS és ICP-MS detektálás esetén alkalmazott mozgófázisokat illékony pufferekkel kellett helyettesítenem. A mozgófázis sótartalma könnyen kirakódhat az ionforrásra és a kónuszra. Ezen okokból új kromatográfias módszereket fejlesztettem ki a 15 arzénvegyület elválasztására. Kationos arzénkomponensek elválasztásához a korábban már bemutatott Agilent, Zorbax 300-SCX erős kationcserélő oszlopot alkalmaztam. Illékony mozgófázisként a hangyasavat ( $pK_a$  3.8) választottam, mely  $pH=2.8-4.8$  között alkalmazható. A  $pH$ -t ammóniával állítottam be. Az eluens ionerősségének és  $pH$ -jának optimálását az 5.1.1 fejezetben tárgyalt szempontokat figyelembe véve végeztem el. Az optimális eluens koncentráció 200 mM, míg az optimális  $pH=2.8$  volt. Ismert, hogy a szerves, illékony oldószerek előnyösen befolyásolják az érzékenységet ESMS detektálás esetén. Azonban ezek sok esetben - főleg, ha apoláris szerkezet is jellemző a molekulára - a retenciót is befolyásolhatják. Ezért a mozgó fázis szerves oldószertartalmának az elválasztásra és az érzékenységre gyakorolt hatását egyaránt érdemes megvizsgálni. Munkám során a mozgó fázishoz szerves oldószerként metanolt használtam. A kidolgozott elválasztástechnikai módszert alkalmazva az eluenshez különböző arányban metanolt adagoltam, majd a metanol koncentrációjának függvényében vizsgáltam a komponensek ionizációjában és retenciójában bekövetkező változásokat. A **19. ábra** ezeket az összefüggéseket szemlélteti.





**19. ábra** Az arzénkomponensek retenció idejének (fent) és intenzitásának (lent) változása az eluens metanoltartalmának függvényében kationcserés elválasztás esetén

A metanoltartalom - retenció idő összefüggések alapján látható, hogy a magasabb metanol koncentráció hatására a retenció idők rövidülnek, ezzel rontva a felbontást. Ez azonban az ES-MS/MS detektálási módszer esetén nem jelent problémát, mivel a szelektivitást nem az elválasztás, hanem a szelektív átmenetek detektálása biztosítja. A metanoltartalom növelésével a kromatográfiás idő rövidül, mely a magasabb metanol koncentráció alkalmazása mellett szól. A nagyobb érzékenység miatt a 30 % metanoltartalmat választottam optimumnak. A metanol koncentrációjának további növelését azonban nem tartottam célszerűnek, mivel a csúcsok annyira összeesznek, hogy esetlegesen a mátrixtól való elválasztást teszi lehetetlenné. Az optimált elválasztás a fentiek alapján a **20. ábrán** látható, komponensenként két átmenettel.

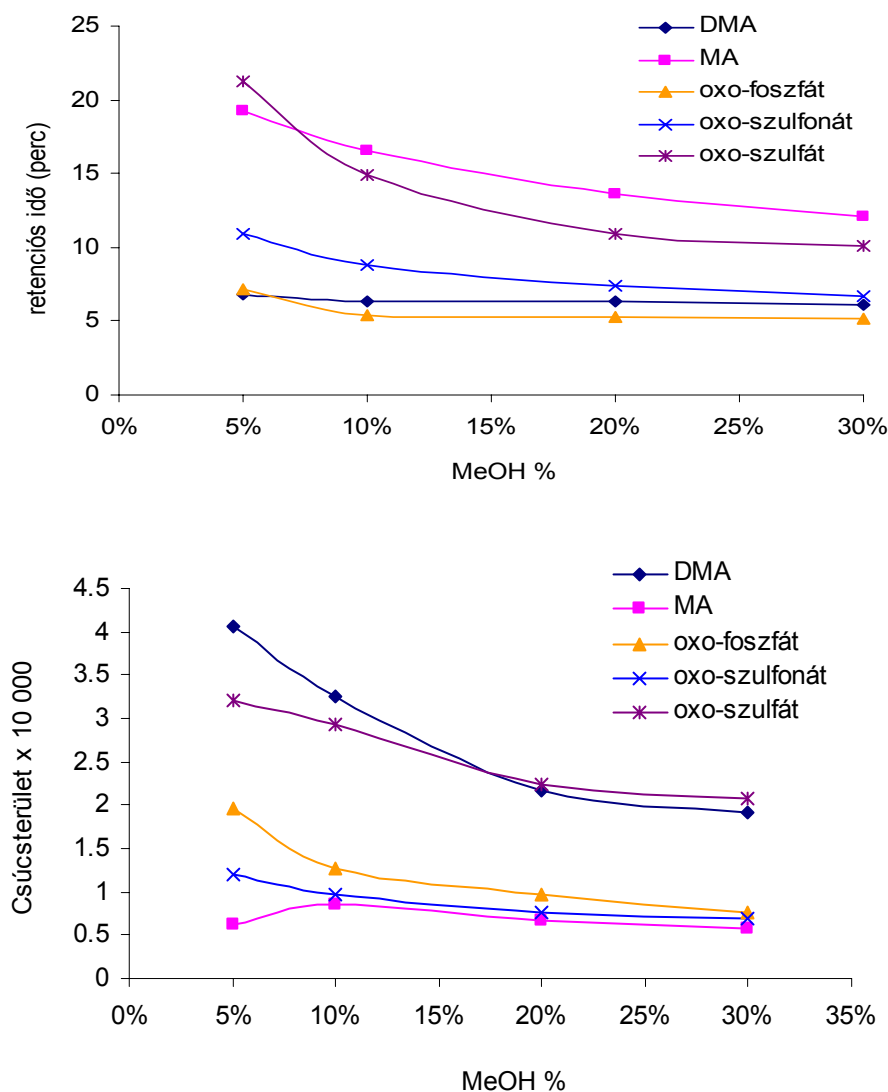


**20. ábra** Izokratikus kationcserés elválasztás Agilent Zorbax 300-SCX erős kationcserélő oszlopon (pH 2.8, 200 mM-os ammónium-formiát, 30% metanol, 0.8 ml/perc, 50 µl injektált mintaoldat)

### 5.1.3.3 Anionos arzénkomponensek elválasztásának kidolgozása

Az anioncserés elválasztás optimalizálása során ugyanazt a gondolatmenetet követtem, mint a kationcsere esetében. A módosulatok elválasztását 250 mm x 4.1 mm-es Hamilton PRP-X100 erős anioncserélő oszlopon végeztem el, melyhez illékony  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  puffert használtam. Az utóbbi években a tio-arzenocukrok környezeti és élelmiszeripari mintákból történő vizsgálata egyre inkább az érdeklődés középpontjába került. Kémiai tulajdonságukból kifolyólag meghatározásuk HPLC-ICPMS technikával csak külön kromatográfiai módszerek alkalmazása esetén volt megoldható. A HPLC-ESMS/MS módszer fejlesztése során egy olyan elválasztástechnikai megoldás kidolgozására törekedtem, mellyel lehetőség nyílik az oxo- és tio-arzenocukrok egyidejű meghatározására. Az elválasztás azonban izokratikus elúcióval nem megoldható, így mindenképpen szükséges volt egy gradiens program kidolgozása. Az anionos komponensek esetében az eluens metanoltartalmának hatását a **21. ábra** mutatja. A standard oldatok kis mennyisége miatt a metanol tio-arzenocukrok intenzitására és retenciójára gyakorolt hatását nem vizsgáltam. A **21. ábrán** látható, hogy a retenciós idők közötti különbség a metanol mennyiségének növelésével kismértékben ugyan, de csökken. Érdekes, hogy az  $\text{MA}^{\text{V}}$  és az oxo-arzenocukor-szulfát helyet cserélnek, ami feltehetően annak köszönhető, hogy a metanol retenciósökkentő hatása az arzenocukor esetén jobban érvényesül. Hasonló jelenség figyelhető meg a  $\text{DMA}^{\text{V}}$  és az oxo-arzenocukor-foszfát esetében is. Sajnos a metanoltartalom növelésével az anionos komponensek ionizációja nem javul. Bár a  $\text{DMA}^{\text{V}}$  a legérzékenyebben kimutatható

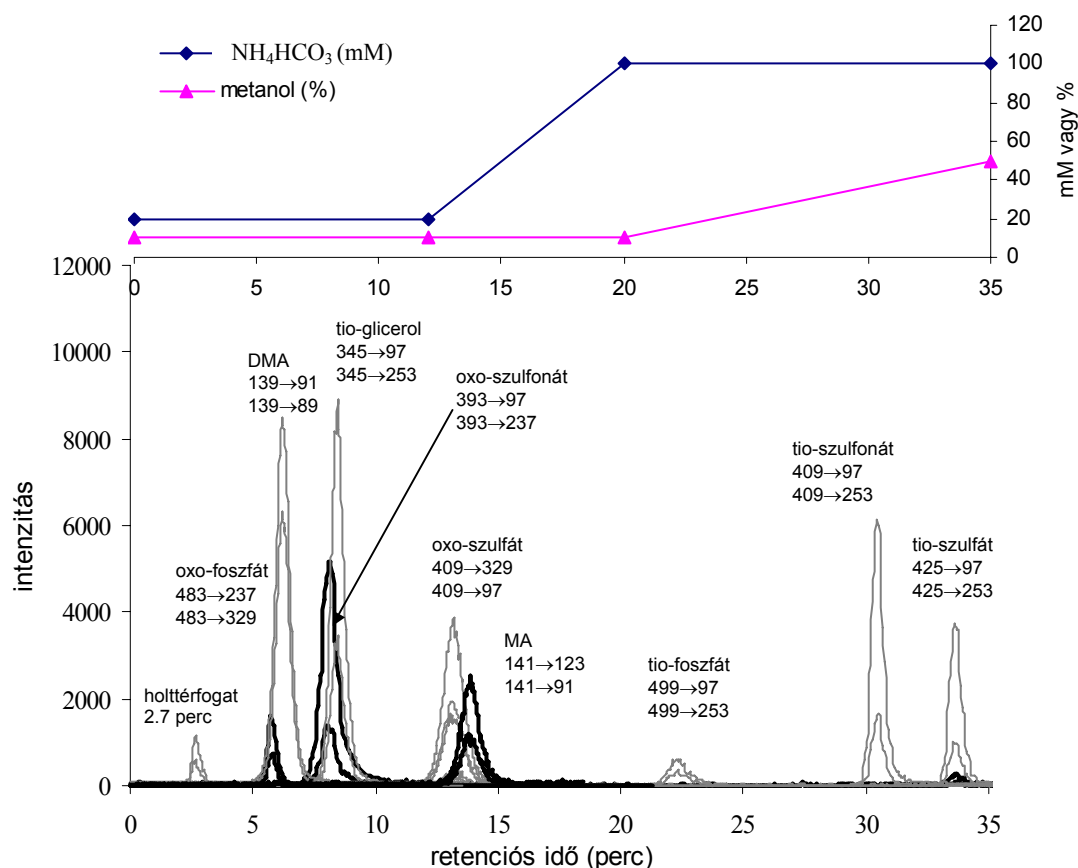
módosulat, ebben az esetben erre a komponensre a legkifejezettebb a metanol negatív hatása. Az ábra alapján az optimális metanoltartalomnak a 10%-ot választottam, mivel a DMA<sup>V</sup> és az oxo-arzenocukor-foszfát a 10 %-os metanoltartalom esetében jobban elváltak egymástól, mint 5 % metanoltartalom esetén, továbbá az oxo-arzenocukor-szulfonát a 20 %-os metanoltartalomhoz képest szintén jobban elválasztható a DMA<sup>V</sup>-tól.



**21. ábra** Az arzénkomponensek retenció idejének (fent) és intenzitásának (lent) változása az eluens metanoltartalmának függvényében anioncserés elválasztás esetén

A DMA<sup>V</sup>, MA<sup>V</sup>, oxo- és tio-arzenocukor komponensek egyidejű meghatározásához kétlépéses gradiens elúciós programot fejlesztettem ki. Az első lépésben az NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> koncentrációját nyolc perc alatt 20 mM-ról 100 mM-ra növeltem meggyorsítva ezzel a MA<sup>V</sup> és az oxo-arzenocukor-szulfát elúcióját. A második gradiens lépés közbeiktatása - mely során a metanol koncentrációja 10 %-ról 50 %-ra növekedett - a tio-arzenocukrok elválasztása miatt volt szükséges. A megnövelt metanoltartalom nagymértékben csökkentette ezen komponensek

retenciós idejét. Ahogy már említettem, a metanoltartalomnak a tio-arzenocukor komponensek jelképzésére gyakorolt hatását nem vizsgáltam. A vizsgálat elvégzését jelen körülmények között nem is tartottam szükségesnek, mivel az 50 % metanoltartalom elengedhetetlen feltétel ezen komponensek elúciójához. Az elválasztást a **22. ábra** szemlélteti arzénmódosulatonként két átmenettel.



**22. ábra** Anioncserés elválasztás és gradiens program Hamilton PRP-X100 erős anioncserélő oszlopon (pH 8.25, 20-100 mM-os  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 10-50 % MeOH, 0.8 ml/perc, 50  $\mu\text{l}$  injektált mintaoldat)

Látható, hogy az egyes arzénmódosulatok esetében a két-két átmenet különböző intenzitással képződik. Ezáltal az érzékenység nem csak módosulatonként, hanem átmenetenként is változó. A MA kivételével (5 ng/ml) az egyes arzénmódosulatok kimutatási határa 0.01-0.3 ng/ml között változott, mely jóval az eddig ismertett csatolt technikák kimutatási határa alatt van. Mind a kationcserés, mind az anioncserés kromatogramokon látható, hogy ellentétben az AFS és ICPMS detektálási módszerekkel **az ESMS esetében a komponensek szelektív meghatározásához előzetes kromatográfiás elválasztás nem feltétlen szükséges**. A különböző átmenetek monitorozása révén az oszlopon koeluálódó komponensek mennyiségi és minőségi meghatározása nem jelent problémát. Ez esetben azonban jogosan vetődik fel a kérdés, hogy

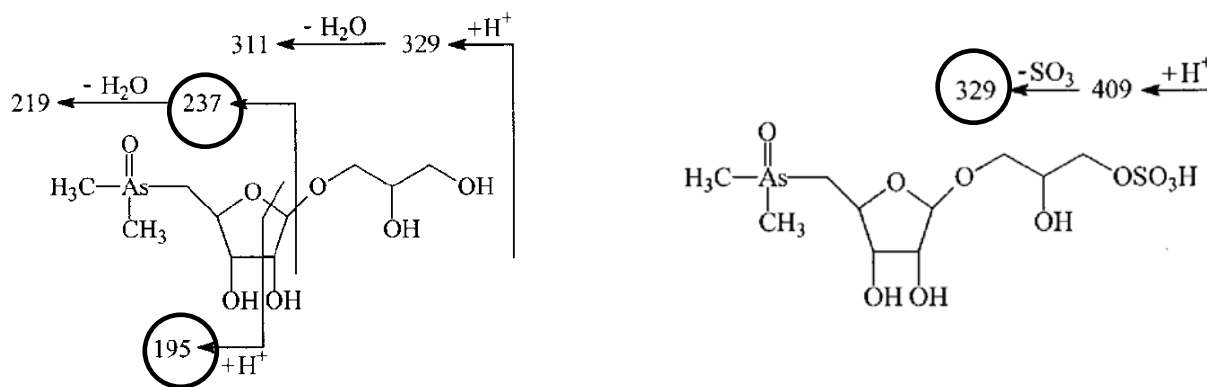
akkor mégis miért van szükség elválasztástechnikai módszerekre? Már említettem, hogy az ESM/MS technikák sokkal érzékenyebben reagálnak a mintamátrixra, mint a már korábban bemutatott elemszelektív detektorok. A kromatográfiás elválasztás révén az arzénmódosulatok nem csak egymástól, hanem a holtterfoggattal eluálódó mátrixkomponensektől is elválaszthatók. Ezért az elválasztástechnikai módszer kidolgozása során az egyik fő szempont a korán eluálódó specieszek minél jobb visszatartásának elérése. Továbbá az átmenetek monitorozásán alapuló detektálás következtében a komponensek nem megfelelő elválasztása az arzénmódosulatok téves azonosításához vezethet.

### 5.1.3.4 A nem megfelelő elválasztásból eredő azonosítási hibák

Előfordulhat, hogy az arzénmódosulatok bizonyos csoportjai, mint például az oxo- vagy tio- arzenocukrok egymáshoz nagyon hasonló fragmentációs viselkedést mutatnak. Az azonosításban fellépő hibák kiküszöbölhetők egy másik jellemző fragmension monitorozásával. A kevésbé érzékeny fragmension detektálása azonban együtt jár a kimutatási határ romlásával. Ezzel szemben a komponensek megfelelő elválasztása esetén nem kényszerülünk kompromisszumos megoldásra. A következőkben három olyan egyedi esetet mutatok be, ahol a pontos azonosítás érdekében a detektálást megelőzően mindenképp szükség van a vizsgált arzénmódosulatok elválasztására.

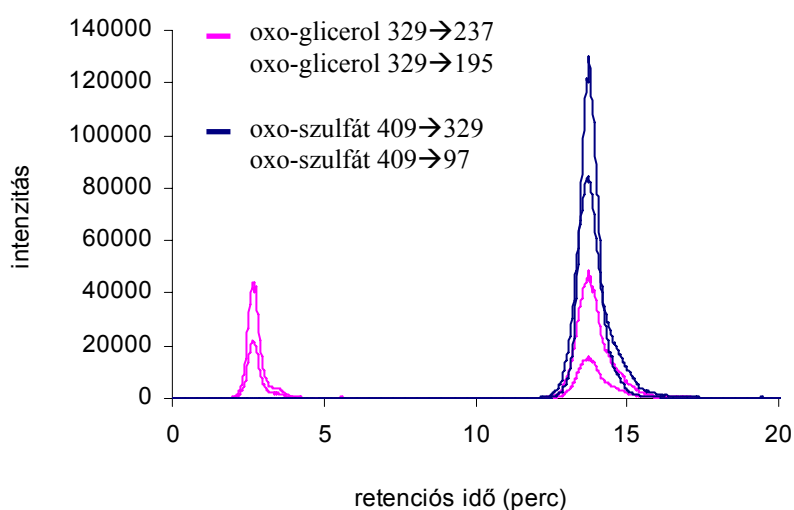
#### 5.1.3.4.1 Oxo-arzenocukor-glicerol és oxo-arzenocukor-szulfát helytelen azonosítása

Először is vizsgáljuk meg a két szóban forgó arzénmódosulatot (23. ábra).



23. ábra Az oxo-arzenocukor-glicerol (balra) és -szulfát (jobbra) fragmensionjai

A **23. ábra** a két komponens szerkezeti képletét és jellemző fragmentációs viselkedését mutatja. Látható, hogy az oxo-glicerol molekulatömege pozitív ionizációs módban ( $[M+H]^+$ )  $m/z=329$ . A komponensfüggő paraméterek optimalása alapján a két legintenzívebb és legjellemzőbb fragmensionja az  $m/z=237$  illetve az  $m/z=195$ . Az oxo-szulfát anyaiionja protonált állapotban  $m/z=409$ . A molekula hasítása során az egyik legintenzívebb fragmension az  $-SO_3$  csoport leszakadását követően visszamaradt  $m/z=329$ -es tömegű molekulaion, mely pontosan megegyezik az oxo-glicerol protonált alakjával. Az alábbi ábrán (**24. ábra**) az oxo-arzenocukor-glicerol és -szulfát elválasztása látható.

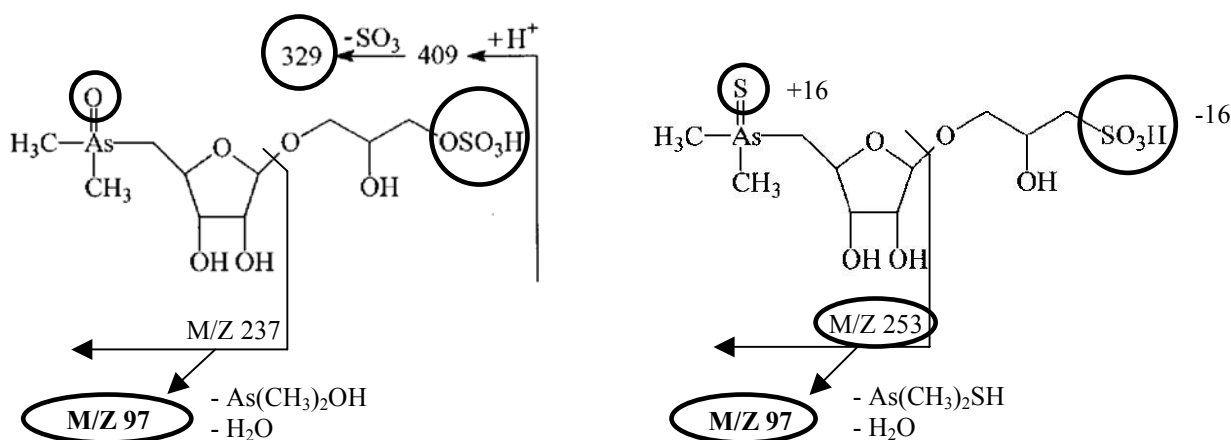


**24. ábra** Oxo-arzenocukor-glicerol és -szulfát elválasztása anioncserélő oszlopon

Az alkalmazott módszer a korábban említett gradiens elúció, ahol az oxo-glicerol a holtterfoggal eluálódik. Látható azonban, hogy az oxo-szulfát retenciójánál ismét megjelenik az oxo-glicerol két jellemző átmenete. A jelenség azzal magyarázható, hogy az elválasztás során a 13 percnél megjelenő oxo-szulfát egy része már az ionforrásban fragmentálódik, elveszítve az  $-SO_3$  csoportot. Ezáltal az ionforrásban keletkezett  $m/z$  329 molekulatömegű fragmension anyaiionként jut a készülékbe, majd az ütközési cellában tovább fragmentálódva az oxo-glicerolra jellemző fragmensionok keletkeznek. Amennyiben a két említett arzenocukor módosulatot a detektálást megelőzően nem választjuk el megfelelően, az oxo-arzenocukor-szulfátot tartalmazó mintában jelentős mennyiségű oxo-arzenocukor-glicerolt is detektálunk annak ellenére, hogy nincs jelen a mintában.

#### 5.1.3.4.2 Az oxo-szulfát és a tio-szulfonát helytelen azonosítása

Nem megfelelő elválasztás esetén az oxo-arzenocukor-szulfát nem csak az oxo-arzenocukor-glicerollal, hanem a tio-arzenocukor szulfonáttal is könnyen összetéveszthető. Ehhez ismét vizsgáljuk meg a két arzénmódosulat szerkezetét.

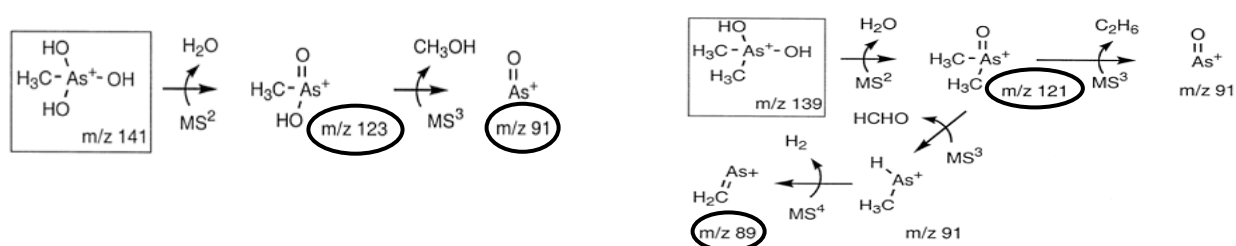


25. ábra Oxo-arzenocukor-szulfát (balra) és tio-arzenocukor-szulfonát (jobbra) fragmensionjai

Az oxo-szulfát  $m/z=329$  fragmensionja mellett a második legintenzívebb fragmens az  $m/z=97$ , mely az oldallánc és a dimetil-arzén rész szakadását, valamint vízkilépést követően a visszamaradt ribóz gyűrűt jelenti. A tio-szulfonát molekulatömege megegyezik az oxo-szulfáttal, mivel az oxigén helyett a dimetil-arzén csoporthoz kettőskötéssel kapcsolódó kén 16-tal növeli, míg az oldalláncon az eggyel kevesebb oxigén 16-tal csökkenti a moláris tömeget. A tio-szulfonát jellemző fragmensei az  $m/z=253$  valamint az oxo-szulfát esetében is megtalálható  $m/z=97$ . Mivel az  $m/z=97$  fragmension mindkét arzénmódosulat fragmentációja során keletkezik, elválasztás hiányában a  $409 \rightarrow 97$ -es átmenet monitorozásakor nem tudjuk biztosan eldönteni, hogy az mely arzénmódosulatról ered. A komponensek kromatográfiás elválasztásával és két jellemző fragmension egyidejű monitorozásával az azonosításból eredő hiba elkerülhető.

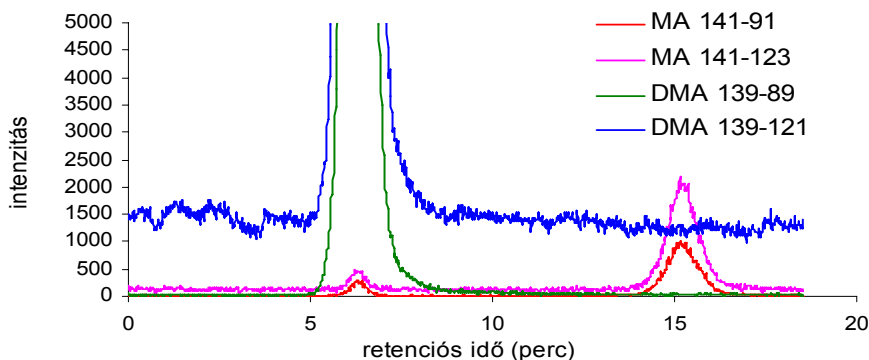
#### 5.1.3.4.3 A DMA<sup>V</sup> és MA<sup>V</sup> helytelen azonosítása

Az egyszeresen és kétszeresen metilált arzénmódosulatok szerkezete és ebből kifolyólag molekulatömege között szintén olyan kicsi az eltérés, hogy az arzenocukrokhoz hasonlóan ESMS/MS vizsgálatukat megelőzően szükség van a komponensek elválasztására. A specieszek jellemző fragmenseit a 26. ábra mutatja. Az MA<sup>V</sup> szerkezetéhez képest a DMA<sup>V</sup> egy hidroxil csoport helyett egy metilcsoportot tartalmaz, ezáltal a moláris tömege kettővel kevesebb. Látható, hogy a jellemző fragmensionjaik tömegében az eltérés szintén kettő, ami önmagában nem okozna problémát a detektálás során.



26. ábra Az  $\text{MA}^{\text{V}}$  (balra) és  $\text{DMA}^{\text{V}}$  (jobbra) fragmentációja

A 27. ábra a  $\text{DMA}^{\text{V}}$  és az  $\text{MA}^{\text{V}}$  elválasztását szemlélteti, mely során a fent bemutatott két-két jellemző fragmensionot detektáltam. Mindkét arzénmódosulat esetében a bevitt minta koncentrációja 50 ng/ml volt, ami jól szemlélteti az ionizációs képességükben tapasztalható különbséget. Látható, hogy a  $\text{DMA}^{\text{V}}$  retenciós idejével megegyezően az  $\text{MA}^{\text{V}}$  mindkét átmenete megjelenik. A magyarázat az arzenocukrok esetében tapasztaltakkal szemben kissé eltérő. Az ionforrásban bekövetkező fragmentáció elvethető, mivel a  $\text{DMA}^{\text{V}}$  molekulatömege a kisebb. Az anyai és a fragmensionok szerkezetét vizsgálva a lehetséges magyarázat a szén természetes izotópeloszlásában keresendő, miszerint a  $^{12}\text{C} : ^{13}\text{C}$  aránya 98.9:1.1 (IUPAC, 1991). Feltételezve, hogy a  $\text{DMA}^{\text{V}}$  esetében az arzénhez kapcsolódó két szénatom a  $^{13}\text{C}$  izotóp, a vegyület molekulatömege kettővel nagyobb, tehát  $m/z=141$ . Az első fragmentációs lépés során a  $\text{DMA}^{\text{V}}$  egy vizet veszít, ezáltal az eredeti két szénatom megmarad. A vízvesztés következtében két  $^{13}\text{C}$ -at tartalmazó fragmension keletkezik ( $m/z=123$ ), tehát a monitorozott  $141 \rightarrow 123$ -es átmenetre jelet fogunk kapni. Nagyobb energiaközlés esetén az  $m/z=121$ -es ion tovább hasad és hasonlóan az  $\text{MA}^{\text{V}}$ -hoz arzén-oxid ( $m/z=91$ ) keletkezik, mely megmagyarázza a  $141 \rightarrow 91$ -es átmenetre kapott jelet a  $\text{DMA}^{\text{V}}$  retenciós idejénél. Az elméletet alátámasztja az is, hogy a hat perces retenciós időnél detektált  $139 \rightarrow 121$  és a  $141 \rightarrow 123$  átmenetekhez tartozó csúcs alatti területek aránya szintén megegyezik a szén természetes izotópeloszlásával. A két speciesz ionizációs határfoka közti különbség olyan nagymértékű, hogy azonos koncentrációnál az 1%-ban  $^{13}\text{C}$ -at tartalmazó  $\text{DMA}^{\text{V}}$ -ra kapott jel összevethető mértékű az  $\text{MA}^{\text{V}}$  jelével.



27. ábra Az  $\text{MA}^{\text{V}}$  és  $\text{DMA}^{\text{V}}$  detektálása anioncserélő oszlopon



## **5.2 Környezeti minták arzénspeciációs elemzése**

### **5.2.1 Tengeri eredetű élelmiszerek arzénspeciációs elemzése HPLC-UV-HG-AFS rendszerrel**

Az irodalmi bevezetőben már említettem, hogy a tengeri szervezetek képesek az arzént nagy mennyiségben felhalmozni, és az emberi szervezet számára nem mérgező formává alakítani. Számos tanulmány foglalkozott a tengeri élőlényekben található arzénkomponensek minőségi és mennyiségi meghatározásával. Azonban a metabolizációs folyamatok lejátszódása és a tengeri élőlények által akkumulált arzénmódosulatok minősége függ a vizsgált fajtól, illetve a táplálékláncban betöltött szerepétől. Ezen felül meghatározó tényezők az adott terület ökológiai jellemzői, melyek szoros összefüggésben vannak a tenger fizikai és kémiai paramétereivel.

Az eddig vizsgált tengeri élőlények főként az Északi-tengerből, a Balti-tengerből, az Atlanti- és Csendes-óceánból származtak. Jelen fejezetben az Égei-tenger térségében található, emberi fogyasztásra szánt kagyló- és halminták arzénspeciációs elemzésének eredményeiről számolok be. A vizsgálat fő célja a tengeri élőlények fogyasztásából eredő, a görög lakosság egészségét veszélyeztető kockázat felmérése a vizsgált egyedekben található arzénmódosulatok meghatározásán keresztül. Ennek fényében megvizsgáltam, hogy az élőlények teljes arzéntartalma és arzénmódosulatainak eloszlása a mintavétel helyétől függően miként változik. Említettem, hogy a módosulatanalitikai vizsgálatok sarkalatos pontjai a mintaelőkészítés, illetve a kinyerés hatékonyságának növelése. Megvizsgáltam, hogy van-e összefüggés a minták zsírtartalma és a kinyerhető arzénkomponensek mennyisége között.

#### **5.2.1.1 Mintavétel**

A mintavétel helyszíneit a **28. ábra** szemlélteti. A vizsgálat tárgyát képező élőlényeket és mintavételi helyüket a **9. táblázat** tartalmazza. A mintavétel során a görög lakosság körében leginkább fogyasztott tengeri kagylókra és halakra koncentráltam. A kagylóminták legnagyobb hányada a Thermaikos öbölből származik, ahol a piacra kerülő kagylók 42%-át tenyésztik. A tenyésztés az öblökben természetes körülmények között történik. A tengeri süllők és a tengeri keszegek tenyésztése a halfarmok termelésének 43 illetve 50 %-át teszik ki. Továbbá a görög lakosság több, mint 40%-a rendszeresen fogyaszt szardellát, illetve szardíniát. A mintákat a mintavételt követően rögtön lefagyasztották, majd liofilezték és homogenizálták.



28. ábra Mintavételi helyek

9. táblázat A vizsgált kagyló és halminták származási helyei és mennyiségei

Minták	Mintavétel helye	Minta mennyisége
<b>Kagylók</b>		
Kagyló 1	Thermaikos öböl, Halasta 1	70 darab
Kagyló 2	Thermaikos öböl, Halasta 2	70 darab
Kagyló 3	Thermaikos öböl, Imathia	70 darab
Kagyló 4	Thermaikos öböl, Pieria	80 darab
Kagyló 5	Saronikos öböl, Elefsis	75 darab
Kagyló 6	Thermaikos öböl, Vespasianou	80 darab
<b>Halak</b>		
Szardella 1	Thermaikos öböl, Thessaloniki	3 kg
Szardella 2	Kavala öböl, Kavala	3 kg
Szardella 3	Saronikos öböl, Piraeus	3 kg
Szardella 4	Thermaikos öböl, Thessaloniki	3 kg
Szardella 5	Pagasitikos öböl, Volos	3 kg
Szardínia 1	Saronikos öböl, Piraeus	3 kg
Szardínia 2	Saronikos öböl, Piraeus	3 kg
Szardínia 3	Dél-Evoiikos öböl, Piraeus	3 kg
Tengeri sügér 1	Korinthiskos öböl 1	15 darab
Tengeri sügér 2	Korinthiskos öböl 2	16 darab
Tengeri keszeg	Korinthiskos öböl 1	20 darab

### 5.2.1.2 Mintaelőkészítés

A minták és a felülűzők teljes arzéntartalmának meghatározásához a mintákat a 4.2-es fejezetben leírt teflonbombás roncsolással készítettem elő. A módosulatanalitikai vizsgálatokhoz a mintákból 3 x 0.2 g -ot mértem be analitikai mérlegen, majd 10 ml ioncserélt vizet hozzáadva szobahőmérsékleten 14 órán keresztül rázattam. Centrifugálást és szűrést követően HPLC-UV-HG-AFS rendszerrel meghatároztam a minták arzénmódosulatainak eloszlását. Minden minta esetében három párhuzamos extrakciót készítettem.

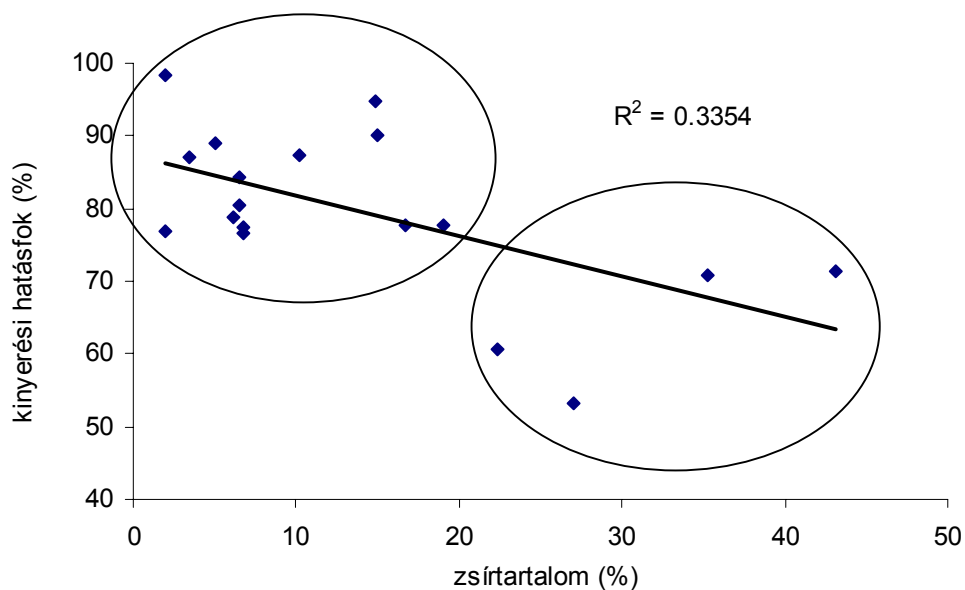
### 5.2.1.3 Teljes arzéntartalom meghatározása

A porminták és felülűzők **teljes arzéntartalmát** a 4.3 fejezetben részletezett ICP-TOF-MS készülékkel határoztam meg. Az eredményeket és a kinyerési hatásfokokat a **10. táblázatban** foglaltam össze. A teljes arzéntartalom meghatározásához alkalmazott módszer szilárd mintára vonatkoztatott kimutatási határa (25 µg As/kg szárazanyag) jóval a mért koncentráció alatt volt. A három párhuzamos vizsgálat relatív szórása megfelelőnek bizonyult, minden esetben 6 % alatt volt. A Thermaikos öböl öt különböző pontján gyűjtött kagylók átlagos arzéntartalma 8.8 és 12.6 mg As/kg között váltakozott. Az eredmények összhangban vannak az irodalomban közölt tengeri kagylók teljes arzéntartalmára kapott értékekkel (SLEJKOVEC, 1996). Ezzel ellentétben a sokkal délebbre fekvő Saronikos öbölből származó kagylók háromszor annyi arzént akkumuláltak. Mivel a vizsgált egyedek ugyanahhoz a kagylófajhoz (*Mytilus edulis*) tartoztak, feltételezhető, hogy a különbség a mintavételi helyek eltérő arzénszennyezettségéből ered. Ezen területről származó élőlények arzéntartalmát eddig még senki sem vizsgálta, erre vonatkozó adatokat az irodalomban nem találtam. Ezenfelül az öböl vizének és üledékének arzéntartalmáról sem áll rendelkezésünkre információ.

A tengeri halaknál a legnagyobb mértékű arzénakkumuláció a nagyvárosok és iparilag fejlett területek környékéről származó szardellák (13-26 mg As/kg) és szardíniák (9.5-13.5 mg As/kg) esetében figyelhető meg. Li és munkatársai (LI, 2003), valamint Suner és munkatársai (SUNER, 2001) Kínából illetve Spanyolországból származó szardínia mintákat vizsgáltak, melyek teljes arzéntartalma harmada illetve tizede az általam vizsgált szardínia mintáknak. A kevésbé iparosodott térségben tenyésztett süllők és keszegek teljes arzéntartalma 2.8 és 6.6 mg As/kg között ingadozott.

Az **extrakciós hatásfokok** 53% és 98% között voltak (**10. táblázat**). A kinyerés szardella minták esetében bizonyult a leghatékonyabbnak, míg a süllő és keszeg minták esetében tapasztaltam a legalacsonyabb hatásfokokat. Általában az alacsony hatásfokokat az irodalomban a minták magas zsírtartalmával magyarázzák, ennek ellenére mégsem áll rendelkezésünkre adat

a zsírtartalomra vonatkozóan. Munkám során ezért meghatároztam a minták **teljes zsírtartalma** és a kinyerés hatásfoka közötti összefüggést.



**29. ábra** Az extrakciós hatásfok a minták zsírtartalmának függvényében

Az alacsony korrelációs együttható ( $R^2=0.3354$ ) alapján nem találtam összefüggést, azonban nem paraméteres statisztikai próba (Spearman  $R=-0.55$ ,  $p=0.02$ ) elvégzését követően, 95%-os konfidencia intervallum esetén szignifikáns eltérést tapasztaltam a vizsgált paraméterek között. Ezek alapján elmondható, hogy az arzén szignifikáns része a süllő és keszeg minták esetében zsírolható frakcióban van jelen.

**10. táblázat** A tengeri eredetű minták zsírtartalma, teljes arzéntartalma, az arzén kinyerési hatásfoka és a mintákban található arzénmódosulatok eloszlása

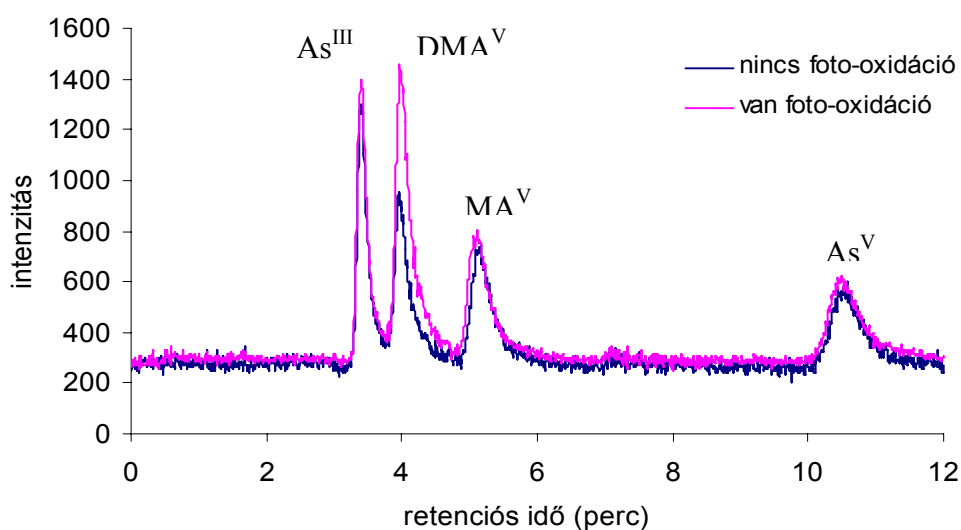
Minták	Zsírtartalom (% száraz- anyagra)	Teljes arzén a pormintákban	Teljes arzén az üledékben	Teljes arzén a felülúszóban	Kinyerési hatásfok (%)	As <sup>III</sup>	DMA <sup>III</sup>	AB	AC	Oxo- glicerol	Oxo-foszfát	Speciesszek összege / felülúszó teljes As (%)	
		mg teljes As/ kg szárazanyag <sup>a</sup>					µg As /kg szárazanyag <sup>a</sup>						
Kagylók													
Kagyló 1	6.5	11.3 ± 0.2	1.81±0.05	9.51 ± 0.42	84	60 ± 3	260 ± 10	5980 ± 210	n.d.	870 ± 40	1920 ± 60	96	
Kagyló 2	6.8	9.2 ± 0.1	1.45±0.04	7.03 ± 0.25	77	n.d. <sup>b</sup>	300 ± 20	3500 ± 120	n.d.	1130 ± 60	1360 ± 90	89	
Kagyló 3	6.2	8.8 ± 0.1	1.8±0.09	6.96 ± 0.27	79	n.d.	200 ± 10	2960 ± 90	n.d.	1280 ± 60	1580 ± 70	86	
Kagyló 4	6.7	12.6 ± 0.5	1.97±0.10	9.80 ± 0.33	78	100 ± 5	110 ± 10	5060 ± 230	n.d.	1420 ± 70	1190 ± 60	80	
Kagyló 5	10.2	34.1 ± 1.9	4.02±0.13	29.8 ± 0.9	87	n.d.	250 ± 20	22590 ± 720	n.d.	1810 ± 90	3560 ± 130	95	
Kagyló 6	6.5	11.6 ± 0.2	1.92±0.04	9.33 ± 0.54	81	n.d.	150 ± 10	5970 ± 270	n.d.	730 ± 30	1420 ± 40	89	
Halak													
Szardella 1	2.0	25.4 ± 0.5	1.52±0.08	25.0 ± 0.8	98	n.d.	n.d.	23110 ± 740	550 ± 30	n.d.	n.d.	95	
Szardella 2	3.5	12.9 ± 0.6	1.44±0.08	11.2 ± 0.6	87	n.d.	n.d.	11280 ± 670	n.d.	n.d.	n.d.	101	
Szardella 3	2.0	13.8 ± 0.7	0.96±0.08	10.6 ± 0.3	77	n.d.	n.d.	11290 ± 410	310 ± 20	n.d.	n.d.	109	
Szardella 4	14.9	25.8 ± 0.7	2.12±0.12	24.4 ± 0.4	95	n.d.	340 ± 20	24180 ± 530	n.d.	n.d.	n.d.	100	
Szardella 5	15.0	24.4 ± 0.9	2.05±0.05	22.0 ± 0.5	90	n.d.	270 ± 10	22110 ± 420	n.d.	n.d.	n.d.	102	
Szardínia 1	16.7	13.5 ± 0.2	1.81±0.02	10.5 ± 0.4	78	n.d.	410 ± 30	10570 ± 380	n.d.	n.d.	n.d.	104	
Szardínia 2	35.3	10.3 ± 0.4	1.67±0.02	7.30 ± 0.29	71	n.d.	350 ± 20	7180 ± 360	n.d.	n.d.	n.d.	103	
Szardínia 3	43.1	9.5 ± 0.3	2.16±0.03	6.77 ± 0.24	71	n.d.	350 ± 10	5510 ± 110	n.d.	n.d.	n.d.	87	
Sügér 1	27.0	2.75 ± 0.12	1.09±0.00	1.46 ± 0.06	53	n.d.	n.d.	1240 ± 80	n.d.	n.d.	n.d.	85	
Sügér 2	19.0	6.55 ± 0.04	0.94±0.01	5.10 ± 0.09	78	n.d.	n.d.	5210 ± 110	n.d.	n.d.	n.d.	102	
Keszeg	22.4	5.26 ± 0.09	1.47±0.09	3.19 ± 0.06	61	n.d.	220 ± 10	2720 ± 70	n.d.	n.d.	n.d.	92	

<sup>a</sup>Az adatok 3 párhuzamos mintaelőkészítés átlagát és relatív szórását mutatják

<sup>b</sup>n.d.: nem detektálható, kimutatási határ alatt

#### 5.2.1.4 Módosulatanalitikai vizsgálatok

A **módosulatanalitikai vizsgálatokhoz** a 4.6.1 fejezetben leírt analitikai mérőrendszert és az 5.1.1 fejezetben részletezett elválasztástechnikai módszereket alkalmaztam. Az eredményeket szintén a **10. táblázatban** tüntettem fel. Korábbi tanulmányokhoz hasonlóan a domináns arzénmódosulat minden minta esetében az AB volt. A bevezetőben említettem, hogy a kationos arzénkomponensek és az arzenocukrok csak fotooxidációs lépés közbeiktatásával alakíthatók hidridaktív komponensekké, ezért azt az anioncserés és a kationcserés elválasztás során egyaránt alkalmaztam. Azonban a minták esetében, az anioncserés oszlopon az oldószerfronttal eluálódó nagy mennyiségű AB lehetetlenné tette a kis retenciós idővel rendelkező arzenit és DMA<sup>V</sup> meghatározását. Amint kiiktattam a fotooxidációt, az anioncserés elválasztás során az arzenit és a DMA<sup>V</sup> meghatározhatóvá vált. Másrészt az arzenocukrok meghatározását ebben az esetben nem tudtam elvégezni. Ezért az anioncserés elválasztást minden minta esetében kétszer (fotooxidációval és anélkül) kellett elvégezni. Ennek kapcsán felvetődik a kérdés, hogy az UV nélkül is hidridaktív komponensek hidridképzési hatásfokát befolyásolja-e az UV?



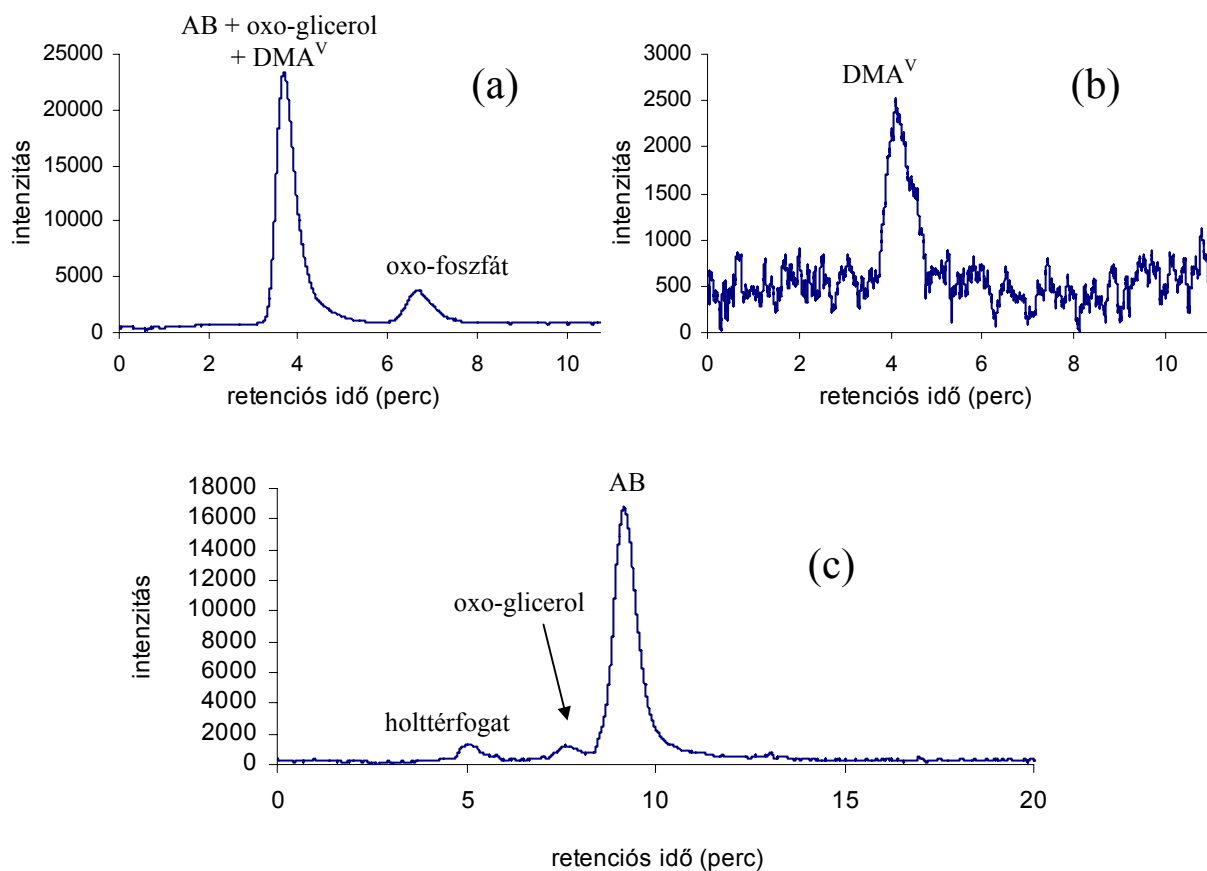
**30. ábra** A fotooxidáció hatása az anionos arzénkomponensekre

A **30. ábrán** a négy anionos arzénkomponens standard kromatogramját tüntettem fel. Látható, hogy mindegyik komponens képes hidrid kialakítására, azonban a fotooxidáció a DMA<sup>V</sup> esetében javítja a hidridképzési hatásfokot. A vizsgálat alapján tehát elmondható, hogy amennyiben a zavaró kationos komponensek miatt a DMA<sup>V</sup> mennyiségét fotooxidáció nélkül határozzuk meg, a kalibrációt is úgy kell végezni.

A **kagylók** vizes extrakcióval kinyerhető arzéntartalmának 50-80%-át az AB tette ki, emellett jelentős mennyiségben voltak jelen az oxo-arzenocukor-glicerol és oxo-arzenocukor-foszfát komponensek is. Minden kagylóminta esetében kis mennyiségben DMA<sup>V</sup>-t (0.9-4.8%) is sikerült

kimutatni a mintákból, mely eredmények összhangban vannak a korábbi kutatási eredményekkel (SLEJKOVEC, 1996; SOROS, 2003). Toxicitás szempontjából talán a legfontosabb tényező az emberi szervezetre mérgező hatású szerves arzénkomponensek mennyisége a vizsgált élelmiszerekben. A mérések során mindössze két kagylómintában mutattam ki szerves arzénit. Mennyisége (0.06 és 0.1 mg As/kg), mely a teljes kinyerhető arzéntartalomnak 0.6-1%-át jelentette, mindkét esetben a kimutatási határ közelében volt. Az általam kapott eredményekkel ellentétben az Adriai-tengerből (SLEJKOVEC, 1996) és az Atlanti-óceánból (LARSEN, 1997) származó kagylók egy nagyságrenddel több szerves arzént tartalmaztak. További érdekesség, hogy a kagylók teljes arzéntartalmának növekedésével az AB és az oxo-arzenocukrok mennyisége is növekszik. Ezzel ellentétben az extraktum arsenit és a DMA<sup>V</sup> koncentrációja nincs összefüggésben a teljes arzéntartalommal, vagyis a magasabb arzéntartalmú kagylók fogyasztása nem feltétlenül jár együtt a mérgezés kockázatának növekedésével. Példaként a **31. ábrán** egy kagylóminta kromatogramjait mutatom be.

A **halak** által felvett arzén több mint 90%-a nem mérgező AB formájában raktározódott a szövetekben. Szerves arzénmódosulatok nem (vagy csak kimutatási határ alatt) voltak jelen a mintákban. DMA<sup>V</sup> mellett két szardella minta esetében nyomokban AC-t sikerült kimutatnom.



**31. ábra** Kagylóminta kromatogramjai: (a) anioncserés elválasztás fotooxidációval; (b) anioncserés elválasztás fotooxidáció nélkül; (c) kationcserés elválasztás fotooxidációval

### 5.2.1.5 Minőségbiztosítás

A méréseim pontosságát DORM-2 hitelesített anyagminta (CRM) vizsgálatával ellenőriztem. Említettem, hogy a megfelelő CRM kiválasztásához különböző szempontokat kell figyelembe vennünk. Egyrészt a CRM mátrixa minél jobban hasonlítson a mintamátrixhoz, továbbá a vizsgált komponensek közel azonos koncentrációban legyenek jelen, mint a mérendő mintában. A rendelkezésünkre álló CRM-ek kis száma miatt nehéz minden egyes követelménynek eleget tenni. A DORM-2 anyagminta a tüskéscápa izomszövetéből készült referenciaminta, mely a teljes arzéntartalom ( $18.0 \pm 1.1$  mg/kg) mellett AB ( $16.4 \pm 1.1$  mg/kg) és TETRA ( $0.248 \pm 0.054$  mg/kg) módosulatokra van hitelesítve. A módszer minőségbiztosításához a CRM-et ugyanannak a mintaelőkészítési folyamatoknak vettem alá, mint a mintákat. A teljes arzéntartalom vizsgálata során a mért értékek ( $18.2 \pm 1.2$  mg/kg) a hitelesített tartományban voltak. A módosulatanalitikai vizsgálatok során csak az AB meghatározását végeztem el, mivel a TETRA a módszer kimutatási határa alatti mennyiségben ( $0.3$  mg As/ kg) volt jelen a mintában. Az általam mért AB koncentráció a referencia mintában  $15.4 \pm 0.9$  mg As/kg volt, ami beleesik a hitelesített koncentrációtartományba.

A hitelesített anyagminta vizsgálatán felül a speciációs vizsgálatok minőségének biztosításához elkészítettem a teljes anyagmérleget, melynek eredményei szintén a **10. táblázatban** találhatóak. Az extrakciót követően az üledék és a felülúszó teljes arzéntartalmának összege minden esetben megegyezik a mintában található teljes arzén mennyiségével, amiből arra következtethetünk, hogy a kinyerés során szennyeződés és anyagvesztés nem lépett fel. Továbbá a speciációs vizsgálat során meghatározott arzénmódosulatok összege megegyezik az extraktum teljes arzéntartalmával. Ezek alapján elmondható, hogy a kromatográfiás vizsgálatok során a vizes extrakcióval kinyert arzénkomponenseket teljes egészében sikerült meghatároznom.

Az alkalmazott HPLC-UV-HG-AFS rendszer alkalmas volt a tengeri kagylók és halak arzénmódosulatainak minőségi és mennyiségi meghatározására. A vizsgált minták átlagos arzéntartalma nedves anyagra számolva  $4.3$  mg As/kg volt (70%-os nedvességtartalommal számolva). Amennyiben a görög lakosság naponta  $18$  g tengeri eredetű táplálékot fogyaszt (SCOOP, 2004),  $70$  kg átlag testsúlyt figyelembe véve a becsült átlagos napi teljes arzénbevitel  $1.1$  µg/nap/ttkg, ami az elviselhető napi arzénbevitel (Tolerable Daily Intake =  $2$  µg/nap/ttkg) alatt van. A **speciációs eredményeket is figyelembe véve** - mely szerint az arzén legnagyobb része az emberi szervezet számára nem mérgező AB formájában van jelen a mintákban - **a vizsgált tengeri eredetű élelmiszerek fogyasztása nem jár egészségkárosító hatással.**



## **5.2.2 Édesvízi tápláléklánc egyedeinek arzénspeciációs vizsgálata HPLC-ICPMS rendszerrel**

A **2.7.2 fejezetben** irodalmi adatokra támaszkodva részleteztem az édesvízi élőlények arzénspeciációs eredményeit. Az eddigi vizsgálatok nem mutatnak egységes módosulateloszlást, sok helyen ellentétekbe ütközünk. Doktori munkám ezen fejezetében ezért az édesvízi szervezetek arzénakkumuláló képességét és azok arzén-speciesz mintázatának meghatározását tűztem ki célul. Az arzénvegyületek táplálékláncon keresztüli körforgásának lehető legátfogóbb tanulmányozásához a vizsgálat tárgyát képező élőlények körét igyekeztem minél jobban kiterjeszteni.

### **5.2.2.1 Mintavétel**

A vizsgált minták listáját a **11. táblázat** tartalmazza, melyben a könnyebb azonosítás érdekében a magyar és latin neveket egyaránt feltüntettem. A mintákat 2004. júniusában Dr. Váradi László (Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszék) és a helyi halászok segítségével gyűjtöttem a Duna paksi szakaszán. Az élőlények mellett üledék- és vízmintát is gyűjtöttem az akkumuláció mértékének meghatározásához. A vízmintákat 1 v/v %-os salétromsavval a helyszínen savanyítottam, majd a vizsgálat elvégzéséig + 4 °C-on tároltam. Az üledékmintát fagyasztva szárítottam, homogenizáltam és szobahőmérsékleten tároltam. A gyűjtött szervezetek között egy algafaj, öt növényfaj, hét halfaj (mindenevő és ragadozó) egy kagylófaj, egy szivacs faj és egy békafaj szerepel. Az alga esetében élő, valamint a folyóparton áradás után visszamaradt és a nap által kiszáritott algát is gyűjtöttem. A növénymintákat és a szivacsmintákat (10 db) teljes egészében liofileztem, porrá törtem, majd homogenizáltam. A kagylóból szintén két fajta mintát (10-10 db) szedtem. Az egyik mintacsoport a főágból, a másik pedig a Duna ugyanazon szakaszán található kisebb holtágából származott. A kagylók héját eltávolítottam, a lágy szöveteket együttesen dolgoztam fel. A békamintákat (5 db) egészben liofileztem majd őröltem és homogenizáltam. A halakból 5-5 gardát, jászkeszeget és süllőt dolgoztam fel, míg bodorkából és karikakeszezből rendelkezésemre álló nagy mintaszám párhuzamos mintacsoportok kialakítását (3 x 5-5) tette lehetővé, melyeket a **11. táblázatban** a,b,c betűkkel jelöltem. Minden esetben a halak izomszövetét külön vizsgáltam. Ahol a rendelkezésre álló minta mennyisége lehetővé tette, külön vizsgáltam a halak pikkelyét, ikráját és máját. A fejlődési szakaszok nyomon követésére különböző korú halivadékokat (néhány naposat és néhány hónaposat) is gyűjtöttem. Az ivadékokat a békákhoz hasonlóan az izomszövet és a belső szervek szétválasztása nélkül egyben dolgoztam fel.

### 5.2.2.2 Mintaelőkészítés

A porminták és az extraktumok teljes arzéntartalmának meghatározásához mintaelőkészítésként a **4.2 fejezetben** leírt magas nyomású mikrohullámú roncsolót alkalmaztam az ott feltüntetett paraméterek mellett. A módosulatanalitikai vizsgálatokhoz a mintákból 0.2 g-ot mértem be, majd 7 ml ioncserélt vizet adtam hozzá. Ezt követően a mintákat az extrakciót elősegítendő ultrahang szondával 30 másodpercig ultrahangoztam, majd 10 ml-re töltve egy éjszakán át szobahőmérsékleten rázattam, centrifugáltam (20 percig, 4500 ford./perc) és szűrtem ( $0.45\ \mu\text{m}$ ).

### 5.2.2.3 Teljes arzéntartalom meghatározása

A minták **teljes arzéntartamát** ICP-Q-MS-sel határoztam meg, melynek eredményeit a **11. táblázatban** tüntettem fel. Zárójelben a három párhuzamos mérés átlagértékéhez tartozó abszolút szórások találhatók. Az üledék teljes arzéntartalma átlagosan 3.6 mg As/kg, ami a KöM-EüM-FVM-KHVM együttes rendeletében meghatározott intézkedési szennyezettségi határérték alatt (20 mg As/kg) van (10/2000. (VI. 2.)). A vízminták mérése alapján szintén kijelenthető, hogy a Duna vizsgált szakasza arzénszennyezettség szempontjából nem sorolható a veszélyeztetett területek közé, mivel teljes arzéntartalma ( $1.1\ \mu\text{g As/l}$ ) a megengedett  $10\ \mu\text{g/l}$  alatt van és elmarad az ország keleti régióiban mért, sokszor nagyságrendekkel nagyobb arzénkoncentrációktól (SMEDLEY, 2002). A víz alacsony arzénkoncentrációja ellenére a vizsgált területekről származó élőlények egy részében jelentős mennyiségű arzént mutattam ki. A legnagyobb mértékű akkumuláció a kagylók esetében figyelhető meg, ahol a teljes arzéntartalom 9-12 mg As/kg között volt. Ezzel szemben a legkevesebb arzént az édesvízi halak esetében detektáltam. Az előző fejezetben vizsgált tengeri kagylók és halak eredményeivel összehasonlítva látható, hogy míg az édesvízi kagylók tengeri fajtársaikkal megegyező mennyiségben akkumulálják az arzént, addig az édesvízi halak jelentősen kevesebb mennyiségű arzént képesek elraktározni.

A bodorka mintacsoportokban (a,b,c) található halak átlagos arzéntartalma 0.4 mg As/kg körül ingadozik, míg a karikakeszeg minták között nagyobb mértékű inhomogenitás figyelhető meg. Az ivadék halakat valamivel nagyobb, 1.3 mg As/kg teljes arzéntartalom jellemzi. Az általam vizsgált minták eredményei alapján azonban az ivadékok kora és teljes arzéntartalma között nem találtam összefüggést. Három halfaj esetében meghatároztam a máj teljes arzéntartalmát is, és azt tapasztaltam, hogy a májban nagyobb mennyiségű arzén raktározódik el mint a hal húzában. Ez a különbség a süllő esetében volt a legszembetűnőbb, ahol a máj négyszer

annyi arzént tartalmazott, mint az izomszövet. Ezzel szemben a pikkelyből a hal húzához hasonló mennyiségű arzént mutattam ki.

Az akkumuláció mértékében tapasztalt különbségek az édesvízi élőlények szervezetében lejátszódó és a tengeriektől eltérő lebontási folyamatokra vezethetők vissza. A módosulatanalitikai vizsgálatok részletesebb betekintést adnak az édesvízi szervezetek arzénfelhalmozási képességeiről. Az alga és növény minták teljes arzéntartalma 1-10 mg As/kg között ingadozott, amely megegyezik az irodalomban közölt adatokkal.

**11. táblázat** A vizsgált édesvízi minták (n=3) teljes arzéntartalma (mg As/kg száraz.) és szórása (SD)

<b>Minták</b>	<b>Teljes arzéntartalom</b>	
víz (µg As/l)	1.1	(0.2)
üledék	3.60	(0.24)
<b>Algák</b>		
zöld alga (élő) - <i>Cladophora sp.</i>	9.33	(0.66)
zöld alga (nap szárította) - <i>Cladophora sp.</i>	5.06	(0.41)
<b>Növények</b>		
süllő hínár - <i>Myriophyllum sp.</i>	5.42	(0.43)
érdes tócsagaz - <i>Ceratophyllum demersum</i>	3.38	(0.28)
rucaüröm - <i>Salvinia natans</i>	4.93	(0.38)
békatutaj - <i>Limnobium spongia</i>	4.40	(0.40)
sás - <i>Carex sp.</i>	1.24	(0.07)
<b>Állatok</b>		
szivacs - <i>Ephydatia fluviatilis</i>	8.07	(0.71)
kagyló (főág) - <i>Unio pictorum</i>	9.31	(0.59)
kagyló (holtág) - <i>Unio pictorum</i>	11.6	(0.76)
ivadék (több fajta hal) 1-2 napos	1.37	(0.07)
ivadék (több fajta hal) 1-2 hónapos	1.21	(0.08)
busa - <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	1.17	(0.06)
karika keszeg A - <i>Blicca bjoerkna</i>	1.58	(0.08)
karika keszeg B - <i>Blicca bjoerkna</i>	0.713	(0.052)
karika keszeg C - <i>Blicca bjoerkna</i>	0.487	(0.047)
bodorka A - <i>Rutilus rutilus</i>	0.399	(0.031)
bodorka B - <i>Rutilus rutilus</i>	0.403	(0.038)
bodorka C - <i>Rutilus rutilus</i>	0.372	(0.033)
garda - <i>Pelecus cultratus</i>	0.416	(0.042)
jászkeszeg - <i>Leuciscus idus</i>	0.247	(0.029)
süllő - <i>Stizostedion lucioperca L.</i>	0.256	(0.023)
bodorka máj	0.523	(0.036)
süllő máj	1.00	(0.08)
jászkeszeg máj	0.345	(0.033)
jászkeszeg ikra	0.193	(0.021)
süllő pikkely	0.200	(0.018)
jászkeszeg pikkely	0.116	(0.012)
béka - <i>Rana sp.</i>	2.52	(0.15)

#### 5.2.2.4 Extrakciós hatások, anyagmérés

A teljes anyagmérés elkészítésének egyik célja a mérésünk minőségbiztosítása, és annak ellenőrzése, hogy a teljes arzéntartalom meghatározása során, illetve a módosulatanalitikai vizsgálatok során kapott eredmények kellő megbízhatósággal reprezentálják a minta állapotát. A speciációs vizsgálatok két meghatározó lépést foglalnak magukba, nevezetesen az arzénkomponensek kinyerését és a kinyert módosulatok szelektív elválasztását. Nagyon fontos tehát megállapítani, hogy az esetlegesen fellépő veszteség melyik szakaszban következik be. Ez az édesvízi minták esetében fokozott szerepet kap, így ebben a fejezetben az anyagmérés - melyet a vizsgálat minden egyes lépésére meghatároztam - a kinyerési hatásokkal közösen tárgyalom. Céлом egy egyszerű vizes extrakció elvégzése volt, melynek köszönhetően a mintákat közvetlenül, előzetes bepárlás és visszaoldás nélkül juttathattam a HPLC-ICPMS rendszerbe. A korábbi teljes arzéntartalom vizsgálatok igazolják, hogy az alkalmazott módszer pontos és precíz (RSD 5-10%), ezért a minta és a szűrt felülúszó teljes arzéntartalmának meghatározásához egyaránt a nedves roncsolásos módszert alkalmazva, a kinyerési hatások meghatározására egy megbízható eljárás áll a rendelkezésünkre. A mintamátrix hatása miatt azonban a roncsolmányok ICPMS vizsgálatának eredményei nem mindig egyeznek az extraktumok HPLC-ICPMS meghatározása során kapott értékekkel. A kromatográfiás mérések során a mintamátrix jelre gyakorolt hatásából eredő eltérések figyelembevételére az extraktumok teljes arzéntartalmát egy harmadik, úgynevezett '**flow injection**' módban is meghatároztam. Ebben az esetben a kationos elválasztásnál alkalmazott piridin-formiát puffert használtam eluensként (20 mM-os, pH 2.6) úgy, hogy a nagynyomású pumpa és az ICPMS között található kromatográfiás oszlopot eltávolítottam. Ezek alapján az extraktum teljes arzéntartalmát közvetlenül, előzetes roncsolás nélkül, standard addíciós módszerrel határoztam meg. A kis mintamennyiség és az alacsony összszén koncentráció miatt a módosulatanalitikai vizsgálatokat csak 16 minta esetében végeztem el. A vizsgált mintákat a **12. táblázatban** tüntettem fel, ahol a teljes anyagmérés következő adatait is részleteztem:

- az extraktumok teljes arzéntartalma három különböző módszerrel meghatározva
- extrakciós hatások
- oszlopvisszanyerési hatások kétféleképpen számolva

Az adatok több szempontból is értékelhetők, melyeket a következőkben részletezem. **Először** is az extrakciós hatások a legtöbb minta esetében 50 % alatti. Ezek az értékek erősen eltérnek a tengeri szervezetek esetében elért extrakciós hatásoktól (általában > 70 %, gyakran akár >95 %). **Továbbá** az extraktumok teljes arzéntartalmának meghatározásakor a szokványos roncsolásos módszerrel végzett ICPMS vizsgálat eredményei és a 'flow injection' ICPMS mérés

eredményei összhangban voltak. A legtöbb minta esetében a különbség 8 % alatti, ami feltehetően a módszerek szórásából adódik. Valamivel nagyobbak az eltérések a halak esetében (pl.: busa 0.14 mg As/kg  $\Leftrightarrow$  0.16 mg As/kg), azonban az alacsony összarszenkoncentráció miatt ezek az értékek is közel azonosnak mondhatók.

## 12. táblázat Teljes anyagmérleg

Minták	Koncentráció [mg As/kg szárazanyag]			Kinyerési hatásfok (%) <sup>b</sup>	Oszlop- visszanyerési hatásfok 1 (%) <sup>c</sup>	Oszlop- visszanyerési hatásfok 2 (%) <sup>d</sup>
	Össz. As az extr.-ban (roncsolással ICPMS) <sup>a</sup>	Össz. As az extr.-ban (‘flow-inject.’ ICPMS) <sup>a</sup>	Speciesszek összege (HPLC- ICPMS) <sup>a</sup>			
Algák						
zöld alga (élő)	3.59	3.54	3.48	38	97	98
zöld alga (nap szárította)	0.49	0.48	0.44	10	90	92
Növények						
süllő hínár	1.42	1.39	1.18	26	83	85
érdes tócsagaz	1.03	1.10	1.01	30	98	92
rucaüröm	1.52	1.45	1.37	31	90	94
békatutaj	1.38	1.30	1.33	31	96	102
sás	0.66	0.69	0.56	53	85	81
Állatok						
szivacs	2.46	2.70	2.51	30	102	93
kagyló (főág)	4.76	4.84	3.47	51	73	72
kagyló (holtág)	5.14	4.78	3.54	44	69	74
ivadék 1-2 napos	0.35	0.38	0.23	26	66	61
ivadék 1-2 hónapos	0.33	0.39	0.25	27	76	64
busa	0.14	0.16	0.03	12	21	19
karikakeszeg A	0.94	0.74	0.37	59	39	50
karikakeszeg B	0.26	0.33	0.14	36	54	42
béka	1.62	1.67	1.69	64	104	101

<sup>a</sup> két párhuzamos extrakció átlaga; az átlaghoz tartozó szórás minden esetben 5 % alatti

<sup>b</sup> kiszámítása: teljes As az extraktumban (‘flow injection’) / teljes As a pormintában (roncsolás) \* 100

<sup>c</sup> kiszámítása: speciesszek összege / teljes As az extraktumban (roncsolás)

<sup>d</sup> kiszámítása: speciesszek összege / teljes As az extraktumban (‘flow injection’)

**Harmadrészt** a minták egy részénél az oszlopra felvitt arzén mennyisége (teljes arzén az extraktumban) jól egyezik a kromatográfiásan meghatározott komponensek mennyiségének összegével. Kivételt képeznek a halminták, ahol az arzénkomponensek összege az extraktum teljes arzéntartalmának csak 21-64 %-át teszi ki. A legrosszabb oszlopvisszanyerési hatásfokot a busaminták esetében tapasztaltam. Habár ez az észrevétel különleges problémát sejtet, található rá ésszerű magyarázat: ha a mintákban található kevés mennyiségű összarszen több arzénmódosulat között oszlik meg, az egyes arzénkomponensek a kimutatási határ alatti koncentrációk miatt nem kvantifikálhatók, így a módosulatok összegének kiszámításakor nem is

tudjuk figyelembe venni őket. A kagylóminták eredményeit megvizsgálva azonban kiderül, hogy nem csak az alacsony összarszen koncentráció a felelős az alacsony oszlopviasszanyerési hatásfokokért, ugyanis a nagyságrenddel több arzént tartalmazó kagylók esetében is a legnagyobb érték 73 % volt. Mindemellett a kagylóminták szokatlan specieseloszlást mutattak: a fő arzénmódosulat például váratlan kromatográfiás viselkedést mutatott, melyet a későbbiekben fogok részletezni. Az eltérő specieszmintázat miatt elképzelhető, hogy az édesvízi kagylók olyan más, eddig nem ismert formákban raktározzák el az arzént, melyek az alkalmazott kromatográfiás rendszerrel nem moshatók le az oszlopról.

Az eredmények azt mutatják, hogy a 'flow injection' módszer alkalmas az extraktumok teljes arzéntartalmának roncsolás nélküli meghatározására. A módszer előnye, hogy figyelembe veszi a kromatográfiás mérés során esetlegesen fellépő mátrixhatásokat. A kis arzéntartalmú minták vizsgálatánál nagy előny, hogy a roncsolásos módszerrel ellentétben 'flow injection' esetén nem kell további hígítási lépéssel számolni. Emellett a vizsgálat idő- és költségkímélő.

Az irodalomban gyakran találkozunk olyan eredményekkel, ahol a mért arzénkomponensek mennyiségének összegét százalékosan adják meg a minta teljes arzéntartalmához képest. Ez azonban egyáltalán nem egyenlő a kinyerési hatásfokkal. Az anyagmérlegből látható, hogy a kromatográfiás vizsgálatok során nem mindig tudjuk meghatározni az extraktumban található összes arzénkomponens mennyiségét, ezért a kinyerés illetve az oszlopviasszanyerés hatásfokának meghatározásánál mindig körültekintően kell eljárunk.

#### **5.2.2.5 Módosulatanalitikai vizsgálatok**

A módosulatanalitikai vizsgálatokhoz az **5.1.2 fejezetben** bemutatott HPLC-ICPMS kapcsolt technikákat alkalmaztam. Az anioncserés módszer egyik hátránya, hogy pH=5.6-on a holtterfogatnál eluálódó arzenit nem határozható meg közvetlenül. Koncentrációja az anioncserés elválasztáskor a holtterfogatnál eluálódó csúcs alatti terület és a kationcserés elválasztás során meghatározott kationos komponensek csúcsalatti terület-összegeinek különbségéből számolható. A speciációs vizsgálatokhoz mintánként több párhuzamos extrakciót végeztem. Az átlagértékekhez tartozó bizonytalanságok minden esetben 10 % alatt voltak (**13. táblázat**).

**13. táblázat** Az édesvízi tápláléklánc egyedeinek arzénspeciációs eredményei

Minták	Koncentráció [mg As /kg szárazanyag]													
	As <sup>III</sup>	As <sup>V</sup>	MA <sup>V</sup>	DMA <sup>V</sup>	TMAO	AB	AC	TETRA	oxo- arzenocukor -glicerol	oxo- arzenocukor -foszfát	oxo- arzenocukor -szulfonát	tio- arzenocukor -glicerol	tio- arzenocukor -foszfát	
zöld alga (élő)	n.kv.	<b>0.36</b>	<0.03	<0.03	<0.03	<0.02	<0.02	<0.02	<b>2.98</b>	<0.03	<b>0.17</b>	<0.04	<0.04	
zöld alga (nap szárította)	<b>0.13</b>	<b>0.29</b>	<0.03	<0.03	<0.03	<0.02	<0.02	<b>nyomok- ban</b>	<0.02	<0.03	<0.08	<0.04	<0.04	
süllő hínár	<b>0.26</b>	<b>0.92</b>	<0.03	<0.03	<0.03	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.03	<0.08	<0.04	<0.04	
érdes tócsagaz	<b>0.19</b>	<b>0.82</b>	<0.03	<0.03	<0.03	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.03	<0.08	<0.04	<0.04	
rucaüröm	<b>0.40</b>	<b>1.01</b>	<0.03	<0.03	<0.03	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.03	<0.08	<0.04	<0.04	
békaturaj	<b>0.25</b>	<b>1.00</b>	<0.03	<0.03	<0.03	<0.02	<0.02	0.07	<0.02	<0.03	<0.08	<0.04	<0.04	
sás	<b>0.14</b>	<b>0.34</b>	<0.03	<b>nyomok- ban</b>	<0.03	<0.02	<0.02	<b>0.05</b>	<0.02	<0.03	<0.08	<0.04	<0.04	
szivacs	<b>0.60</b>	<b>1.53</b>	<0.03	<b>0.12</b>	<0.03	<0.02	<0.02	<0.02	<b>0.29</b>	<0.03	<0.08	<0.04	<0.04	
kagyló (főág)	n.kv.	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<b>0.11</b>	<0.02	<0.02	<b>0.89</b>	<b>1.85</b>	<0.08	<b>0.21</b>	<b>0.39</b>	
kagyló (holtág)	n.kv.	<b>0.07</b>	<0.03	<0.03	<0.03	<b>0.06</b>	<0.02	<0.02	<b>1.07</b>	<b>1.69</b>	<0.08	<b>0.48</b>	<b>0.06</b>	
ivadék 1-2 napos	<0.02	<b>0.10</b>	<0.03	<0.03	<b>nyomok- ban</b>	<0.02	<0.02	<0.02	<b>nyomokban</b>	<b>0.12</b>	<0.08	<0.04	<0.04	
ivadék 1-2 hónapos	<0.02	<b>nyomok- ban</b>	<0.03	<0.03	<b>0.08</b>	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<b>0.12</b>	<0.08	<0.04	<0.04	
busa	<0.02	<0.03	<0.03	<0.03	<b>0.03</b>	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.03	<0.08	<0.04	<0.04	
karikakeszeg A	<0.02	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<b>nyomok- ban</b>	<0.02	<0.02	<b>nyomokban</b>	<b>0.24</b>	<0.08	<0.04	<b>0.07</b>	
karikakeszeg B	<0.02	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	<b>0.03</b>	<0.02	<0.02	<0.02	<b>0.21</b>	<0.08	<0.04	<b>0.07</b>	
béka	<b>0.50</b>	<b>0.23</b>	<b>0.15</b>	<b>0.27</b>	<b>nyomok- ban</b>	<b>nyomok- ban</b>	<b>nyomok- ban</b>	<b>0.58</b>	<0.02	<0.03	<0.08	<0.04	<0.04	

n. kv. Nem kvantifikálható az oldószerfronttal eluálódó oxo-arzenocukor-glicerol magas koncentrációja miatt

#### 5.2.2.5.1 Édesvízi alga

Hasonlóan a korábbi vizsgálatokhoz a vizsgált édesvízi algák fő arzénkomponense az oxo-arzenocukor-glicerol, mely a kinyerhető arzén 84 %-át tette ki. Az oxo-glicerol mellett oxoszulfonát (5 %) és arzenát (10 %) is volt a mintákban. A másik *Cladophora* faj esetében, melyet a Duna partján gyűjtöttem, teljesen eltérő módosulatanalitikai eredményeket kaptam. Ebben az esetben a teljes arzénnek mindössze 10 %-a volt kinyerhető, összehasonlítva az élő alga esetében elért 38 %-kal. A másik érdekes eredmény, hogy a száraz algából nem sikerült szerves arzenocukor komponenseket kimutatnom. A kinyerhető arzén legnagyobb része arzenát formájában volt jelen, azonban a kinyert arzenát mennyisége megegyezik az élő algából kimutatott arzenát mennyiségével. Elképzelhető, hogy az algában felhalmozódott arzenocukor komponensek a napfény és UV hatására esetleg bakteriális aktivitás következtében olyan arzénkomponensekké bomlottak le, melyek az adott módszerrel nem oldhatók ki. Egy másik lehetséges magyarázat, hogy a száradást és a szövetek összeszűkülését követően az arzenocukor komponensek az elhalt sejtekben rekednek, ezért a kiszáradt sejttel feltárásához és a komponensek kinyeréséhez a mintát erősebb fizikai behatásoknak kell kitenni.

#### 5.2.2.5.2 Édesvízi növények

A kontinentális (nem tengeri) környezet arzénspeciációs irodalma alapján egyértelműen elmondható, hogy a növényekben található fő vízoldható arzénkomponensek a szervesetlen arzenit és arzenát, emellett kisebb mennyiségben az egyszeresen és kétszeresen metilált  $\text{MA}^{\text{V}}$  és  $\text{DMA}^{\text{V}}$  is előfordulhat (KOCH, 1999; KOCH, 2000). Az általam vizsgált édesvízi növéyminták speciesz mintázata megegyezik az irodalomban közölt adatokkal. A növények teljes arzéntartalmának 26-53 %-át sikerült kinyernem, melynek 49-77 %-a szervesetlen arzenát volt.  $\text{DMA}^{\text{V}}$ -t csak a sásban tudtam kimutatni, emellett a sás és a békatutaj minták kisebb mennyiségben TETRA-t is tartalmaztak.

#### 5.2.2.5.3 Folyami szivacs

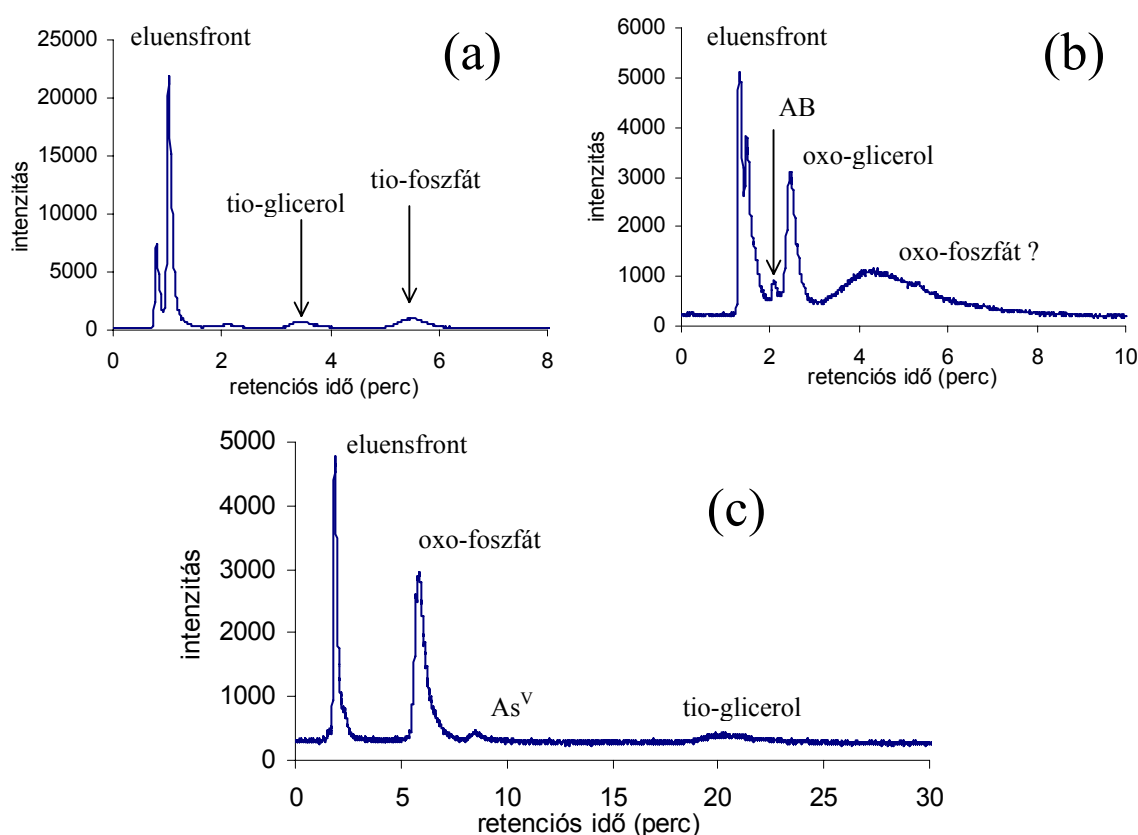
A szivacsok arzénspeciációs irodalma korlátozott, és a korábbi tanulmányok között egyik sem foglalkozott az édesvízi szivacsok arzénmódosulatainak meghatározásával. Shiomi és munkatársai két tengeri szivacs fajt (*Halichondria okadai*, *Spirastrella insignis*) vizsgáltak, és arra az eredményre jutottak, hogy a tengeri élőlényekre jellemzően a szivacsok fő arzénmódosulata is az AB (SHIOMI, 1988). Yamaoka és munkatársai az AB mellett nagy mennyiségben oxo-arzenocukor-foszfátot és 4-9 %-ban oxo-arzenocukor-glicerolt mutattak ki tengeri szivacsokból (YAMAOKA, 2001). A tengeri szivacsokkal ellentétben az általam vizsgált



édesvízi faj legnagyobb mennyiségben szervesetlen arzenitet (20 %) és arzenátot (57 %) tartalmazott. A szerves módosulatok közül a DMA<sup>V</sup> (4 %) és az oxo-arzenocukor-glicerol (11 %) volt kimutatható. További érdekes eredmény, hogy AB-t egyáltalán nem detektáltam a szivacsminákban.

#### 5.2.2.5.4 Édesvízi kagylók

Az általam vizsgált két *Unio pictorum* kagylóminta fő arzénkomponensei a különféle arzenocukrok voltak, míg az AB aránya 1-2 % között ingadozott. A kagylóminták jellemző kromatogramjai a **32. ábrán** láthatóak.



**32. ábra** Holtágból gyűjtött kagyló jellegzetes kromatogramjai: (a) anioncserés elválasztás, pH=10.3; (b) kationcserés elválasztás, pH=2.6; (c) anioncserés elválasztás, pH=5.6

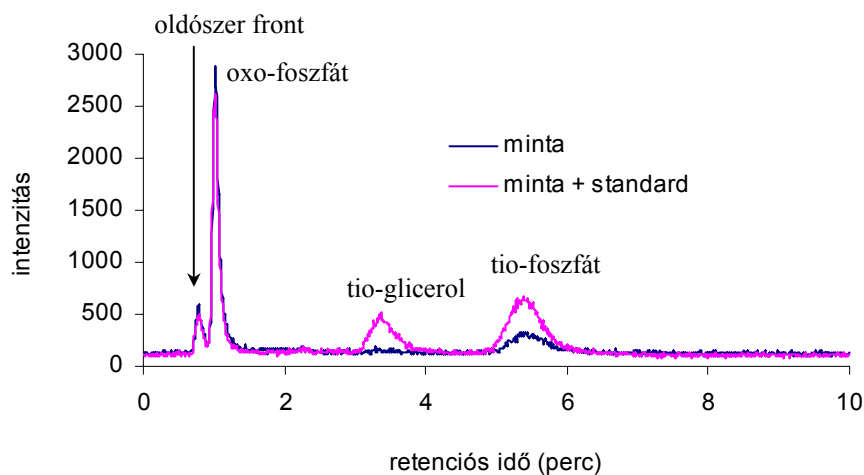
Az AB alacsony koncentrációja ellentétben áll a tengeri kagylók esetében eddig megfigyelt speciesmintázattal, ahol az arzenocukrokkal együtt jelentős hányadát képezték a teljes arzéntartalomnak. Az oxo-arzenocukrok mellett nagyobb mennyiségű tio-arzenocukor-glicerol és -foszfát is található a dunai kagylókban, melyek a kinyerhető arzén 10 %-át tették ki. Korábbi tanulmányok során már több ízben számoltak be tio-arzenocukrok jelenlétéről tengeri

(SCHMEISSER, 2004) és édesvízi kagylókban (SOEROES, 2005b), azonban a vizsgált minták mindkét esetben évekig konzervként, vagy fagyasztva tárolt kagylók voltak. Tekintve, hogy a munkám során vizsgált kagylók frissen gyűjtött és feldolgozott szervezetek voltak, megdölni látszik az a feltevés, hogy a tio-arzenocukor komponensek jelenléte a tárolás során fellépő mikrobiológiai aktivitásnak köszönhető. Eredményeim alapján elmondható, hogy a kéntartalmú arzenocukrok az édesvízi kagylók természetes arzénmódosulatai. Ezen komponensek eredete és kialakulása még nem tisztázott. A környezetből történő felvétele szinte kizárható, hiszen a talajban kizárólag szervesetlen komponensek találhatók, illetve a nagy mennyiségű oxo-arzenocukrok ellenére az alacsonyabb rendű algákban sem mutattak még ki tio-arzenocukor analógokat. Ezeket a vegyületeket feltehetően a kagylók *in vivo* szintetizálják és raktározzák el szöveteikben.

Néhány fontos gondolat erejéig visszakanyarodnék a **32/b ábrára**. Látható, hogy az oxo-glicerol cukrot követően egy több, mint 5 perc széles csúcs jelenik meg a kromatogramon. Kationcserés elválasztásról lévén szó (Zorbax 300-SCX) a detektált komponens viselkedése szokatlan és első ránézésre kationos tulajdonságú arzénmódosulat jelenlétére utal. A széles, elkenődött csúcs a nem megfelelő kromatográfiás paraméterek alkalmazásából eredhet, azonban a korábbi vizsgálatok és módszerkidolgozások során egyik standard arzénkomponens esetén sem tapasztaltam hasonló retenciós viselkedést. Figyelembe véve, hogy a komponens a TMAO retenciós idejénél jelentkezik, a jelenség a mátrixhatásnak tulajdonítható. A pontos azonosítás céljából a csúcst 3 és 6 perc között legyűjtöttem, a kapott 4.5 ml oldatot bepároltam, majd 100 µl ioncserélt vízben visszaoldottam. A legyűjtött komponens anioncserés kromatográfiával pH 5.6 esetén az oxo-foszfát retenciójánál jelent meg. Ezt követően HPLC-ESMS szerves tömegspektrométerrel sikerült bebizonyítanom, hogy a legyűjtött csúcs az oxo-arzenocukor-foszfát. Mivel az alkalmazott paraméterek mellett az oxo-arzenocukor-foszfátnak kationcserélő oszlopon a holtterfoggal kellene jönnie, az elúcióban bekövetkező változás feltehetően a kationcserélő oszlop elhasználódására vezethető vissza. Ennek igazolására egy teljesen új Zorbax 300-SCX oszlopon is megvizsgáltam az arzenocukor viselkedését, és arra az eredményre jutottam, hogy az új oszlopon a várakozásnak megfelelően az oxo-foszfát az oldószer fronttal eluálódott. Az oszlop szokatlanul gyors elhasználódása feltehetően a tio-arzenocukrok szintézisének használt oldatok nagy H<sub>2</sub>S tartalmának köszönhető. Mivel a tio-arzenocukrok egyéb úton történő szintézise egyelőre még nem megoldott, vizsgálatukhoz az eljárás alkalmazása elengedhetetlen. Az egyetlen megoldás, ha az így előkészített standard oldatok mennyiségét az oszlopon minimálisra csökkentjük.

### 5.2.2.5.5 Édesvízi halak

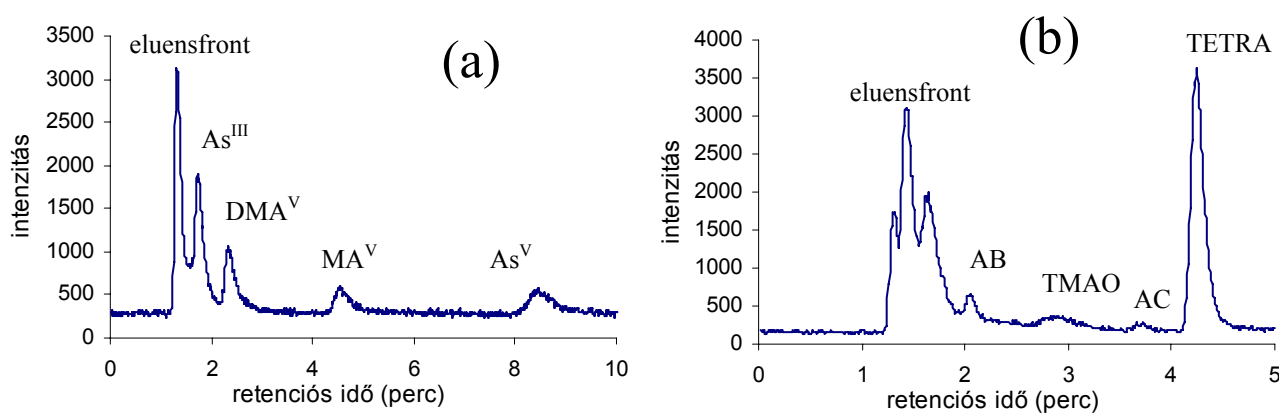
A dunai kagylókhoz hasonlóan az édesvízi halaknál szintén szokatlan, a tengeriektől eltérő módosulateloszlást tapasztaltam. A busa kivételével minden halmintában a fő arzénmódosulat az oxo-arzenocukor-foszfát volt, míg AB-t csak nyomokban detektáltam. Koch és munkatársai által publikált eredményeket követően (KOCH, 2001) ez az első eset, hogy oxo-foszfátot sikerült kimutatni édesvízi halakban. Az általam vizsgált halak esetében mégis a különlegesség az, hogy az oxo-foszfát mellett először detektáltam tio-arzenocukor-foszfátot édesvízi halakban. A kromatogram a **33. ábrán** látható. A teljes bizonyosság érdekében a mintához ismert mennyiségű standard oldatot adtam és ismét felvettem a kromatogramot. A két karikakeszeg minta esetében a tio-foszfát a kinyerhető arzén 10 %-át illetve 20 %-át tette ki. A busa minta érdekessége, hogy a magasabb arzéntartalom ellenére az arzénnek csak a 12 %-a volt kinyerhető az általam alkalmazott extrakciós módszerrel és a HPLC vizsgálatot követően a kinyert arzénnek csak 20 %-át tudtam meghatározni. Továbbá a TMAO volt az egyetlen komponens, amit sikerült detektálnom, melyet korábban Edmonds és munkatársai fő komponensként mutattak ki a *Kyphosus sydneyanus* tengeri halból (EDMONDS, 1997). A busa mellett az ivadék halak is tartalmaztak néhány százalékban TMAO-t, valamint arzénatot. Az emberi szervezetre gyakorolt hatás szempontjából fontos megjegyezni, hogy a kifejlett halak húsa mérgező hatású szervesetlen arzénmódosulatókat nem tartalmazott. Az ivadékokban talált arzénát jelenléte feltehetően a hússal együtt feldolgozásra került belsőségekből - beleértve a belek és azok tartalmát - ered.



**33. ábra** Karikakeszeg minta anioncserés kromatogramja (pH=10.3)

### 5.2.2.5.6 Édesvízi béka

Annak ellenére, hogy a kételtűek jelentős részét képezik az édesvízi ökológiai rendszernek, az irodalomban nem találhatók ezen élőlények arzéntartalmának és arzénmódosulat-eloszlásának meghatározásával foglalkozó tanulmányok. Munkám során ezért fontosnak találtam kiterjeszteni a vizsgálatok körét ezekre az állatokra is. Kromatográfiás vizsgálatok során a vizes extrakcióval kinyert arzén (64 %) teljes mennyiségét sikerült meghatároznom, azaz a módosulatok koncentrációjának összege megegyezett az extraktumban mért teljes arzéntartalommal. A minta érdekes specieszmintázatot mutatott. A két fő komponens a szervetlen arzenit (30 %) és a négyszeresen metilált TETRA (35 %) volt. Emellett mindhárom (MA, DMA, TMAO) köztes metilációs terméket sikerült kimutatnom. A **34. ábrán** látható, hogy a béka minden olyan arzénmódosulatot tartalmazott, melyek részt vesznek a feltételezetten arzenáttal kezdődő és TETRA-val végződő biometilációs folyamatokban (FRANCESCONI, 1997). A fent említett komponenseken kívül AB és AC is jelen volt az általam vizsgált mintákban. Korábbi laboratóriumi vizsgálatok kimutatták, hogy a soksörtéjűek rendjébe tartozó (Polychaeta) tengeri férgek képesek az arzenátot TETRA módosulattá alakítani, azonban ebben az esetben DMA-t nem találtak az állatokban (GEISZINGER, 2002b). A béka esetében kimutatott érdekes specieszmintázat miatt, érdemes lenne egyéb béka fajok arzénspeciációs elemzését is elvégezni, mellyel talán közelebb kerülhetünk az arzén biotranszformációjának megértéséhez. Fontos megjegyezni, hogy az állatokat egészben dolgoztam fel, így további hasznos információt nyújthat a főbb szervek és szövetek külön-külön vizsgálata. Habár a békák alapvetően édesvízi állatok, néhány faj, mint pl. a mangrove mocsarakban élő *Rana cancrivora* sőtűrő. Ez a faj tengeri rákokkal táplálkozik, így az arzénspecieszek eloszlásának összehasonlítása az általam vizsgált egyedekkel szintén érdekes információkat szolgáltatna a két eltérő ökológiai rendszerben lezajló lebontási folyamatokban fellelhető különbségekről.



**34. ábra** Béka minta jellegzetes kromatogramjai: (a) anioncserés elválasztás, pH=5.6; (b) kationcserés elválasztás, pH=2.6

### 5.2.2.6 Minőségbiztosítás

Méréseim minőségbiztosításának egyik részét az **5.2.2.4 fejezetben**, az anyagszámítás részletezésével már tárgyaltam. A vizsgálat tárgyát képező élőlények sokfélesége miatt optimális esetben minden egyes mintamátrixra külön CRM-et kellett volna alkalmaznom, azonban ezen anyagminták elérhetősége miatt ezt nem állt módomban megvalósítani. A teljes arzéntartalom meghatározásánál igyekeztem minél több, a rendelkezésemre álló anyagmintát felhasználni és megvizsgálni. Ezek alapján megvizsgáltam egy referencia vízmintát, egy paradicsomlevél mátrixot, egy tengeri hal húsból és májából készült referenciamintát és egy tengeri mohamintát. A vizsgált CRM-ek, hitelesített értékük és az általam mért értékek a **14. táblázatban** láthatóak. Mivel egy CRM kivételével mindegyik anyagminta kizárólag teljes arzéntartalomra volt hitelesítve, a speciációs vizsgálatokat csak a DORM-2 esetében végeztem el, ahol az általam mért AB koncentrációja  $15.9 \pm 0.3$  mg As/kg volt.

**14. táblázat** Teljes arzéntartalomra vizsgált hitelesített anyagminták

CRM neve	Mintamátrix	Latin elnevezés	Hitelesített érték mg As/kg	Mért érték mg As/kg
NIST 1640	édesvíz		$26.67 \pm 0.41$	$29.89 \pm 1.72$
NIST 1573a	paradicsom levél	Lycopersicon esculentum	$0.112 \pm 0.004$	$0.163 \pm 0.01$
DORM-2	tüskés cápa húsa	Squalus acanthias	$18.0 \pm 1.1$	$17.1 \pm 1.2$
DOLT-1	tüskés cápa mája	Squalus acanthias	$10.1 \pm 1.4$	$10.9 \pm 0.5$
BCR-60	tengeri moszat	Lagarosiphon major	8*	$6.9 \pm 0.3$

\* nem hitelesített érték

### 5.2.2.7 Édesvízi kontra tengeri szervezetek, általános következtetések

Annak ellenére, hogy az édesvízi környezet élőlényeiben előforduló arzénmódosulatról szóló tanulmányok száma elmarad a tengeri élőlényekről szóló tanulmányok számához képest, számos érdekes egyezést és különbséget tapasztaltam a két élőhely lakóiban felhalmozódó arzénmódosulatok eloszlása között. Az algák esetében mind a tengeri mind az édesvízi fajokra az arzenocukor dominancia jellemző, míg a növények fő arzénkomponensei a szervesetlen módosulatok. Az arzénmintázat ily mértékű egyezése azonban egyáltalán nem mondható el a vizsgált állatok esetében. A tengeri állatok magasabb arzénakkumuláló képessége már régóta bizonyított. A módosulatanalitikai eredményeket megvizsgálva arra a következtetésre jutottam, hogy a különbség fő oka az arzenobetain relatív mennyiségének tulajdonítható. Említettem, hogy az arzenobetain neve a hozzá hasonló, és az arzén helyett egy nitrogén atomot tartalmazó glicinbetain elnevezéséből ered. A glicinbetain egy igen fontos ozmolit, mely a sejtekben egy

aktív transzportmechanizmus segítségével akkumulálódik és többek között fontos szerepet játszik az ozmotikus egyensúly fenntartásában és a szövetek kiszáradásának megakadályozásában. Ez a folyamat a nagy sókoncentráció miatt sokkal kifejezőbb a tengeri élőlények esetében. Egy friss tanulmány kimutatta, hogy az AB koncentráció a *Mytilus edulis* kagylókban a víz sótartalmának függvényében változik (CLOWES, 2004), ugyanis az alacsonyabb sótartalmú vízben nevelt állatokhoz képest a magasabb sótartalmú vízben nevelt példányok szignifikánsan több AB-t vettek fel. Korábbi kutatások szerint ugyanis az AB egy járulékosan jelenlévő ozmolit vegyület, mely a szerkezeti hasonlóság miatt egyszerűen csak csatlakozik a glicinbetaint szállító transzporter molekulához (FRANCESCONI, 1997). Az AB dominanciája valamint hiánya a tengeri illetve az édesvízi élőlényekben szintén lehetséges magyarázata az édesvízi állatok esetében tapasztalt alacsony kinyerési hatásfokoknak. Poláros tulajdonságánál fogva az AB mind vízben, mind metanolban - mint a két leggyakrabban alkalmazott oldószerben - kiválóan oldódik. Így az édesvízi állatokkal szemben, ha a fő arzénkomponens az arzenobetain magas kinyerési hatásfok érhető el. Feltehetően az édesvízi szervezetekben jelenlévő, és nem kinyerhető arzénkomponensek a tengeri szervezetekben is jelen vannak, azonban a teljes arzéntartalomnak olyan kis hányadát teszik ki, hogy jelenlétük felett ezidáig elsiklottak a kutatók. Az eredmények toxikológiai szempontból is jelentősek, hiszen a halak és kagylók esetében az arzénre vonatkozó határértékek eltörlését a tengeri eredetű halak vizsgálata során kapott eredményekre alapozták. Az általam vizsgált halak és kagylók kinyerhető arzénmódosulatainak legnagyobb hányada arzenocukor, melyeknek szervezetre gyakorolt hatása egyenlőre még nem ismert. Ezek a vegyületek feltételezhetően nem mérgezőek, azonban felvetődik a kérdés, hogy a ki nem nyert arzén milyen formában van jelen a mintákban? Az alacsony kinyerési hatásfokok miatt toxikológiai következtetéseket ugyan nem tudunk levonni, azonban érdemes elgondolkodni a halak arzéntartalmára vonatkozó határértékek felülvizsgálatán. A nem kinyerhető arzénkomponensek további vizsgálatai hasznosak lehetnek a lebontási folyamatok megismerésében, és az eltérő élőhelyekről származó élőlények arzén-speciesz-eloszlásában eddig ismeretlen hasonlóságok, esetleg eltérések kerülhetnek napvilágra.

### 5.2.3 HPLC-ESMS/MS kapcsolt technika alkalmazási lehetőségei környezeti minták arzénmódosulatainak meghatározására

Ebben a fejezetben az általam újonnan kifejlesztett HPLC-ESMS/MS kapcsolt technikának az alkalmazhatóságát mutatom be néhány korábban HPLC-ICPMS-sel mért minta vizsgálatán keresztül. A minták elemzése során kitérek a minőségi és mennyiségi meghatározásokra, az azokat terhelő hibákra, valamint a hibák kiküszöbölésének módjára. A vizsgálatokhoz az alábbi mintákat választottam ki: TORT-2 CRM, édesvízi kagyló és hal (karikakeszeg), valamint tengeri alga (*Fucus serratus*) minták. A minták kiválasztása során két fő szempontot vettem figyelembe: (i) A minták teljeskörű arzénspeciációs vizsgálatát korábban már elvégezték, illetve elvégeztem HPLC-ICPMS csatolt technikákkal, így azokat az eredményeket össze tudtam hasonlítani a HPLC-ESMS/MS esetén kapott eredményekkel. (ii) Másrészt a tengeri algák és édesvízi minták arzénspeciációs vizsgálata az oxo- illetve tio-arzenocukor komponensek pontos és precíz meghatározása miatt kihívást jelent az arzénspeciációval foglalkozó kutatók számára.

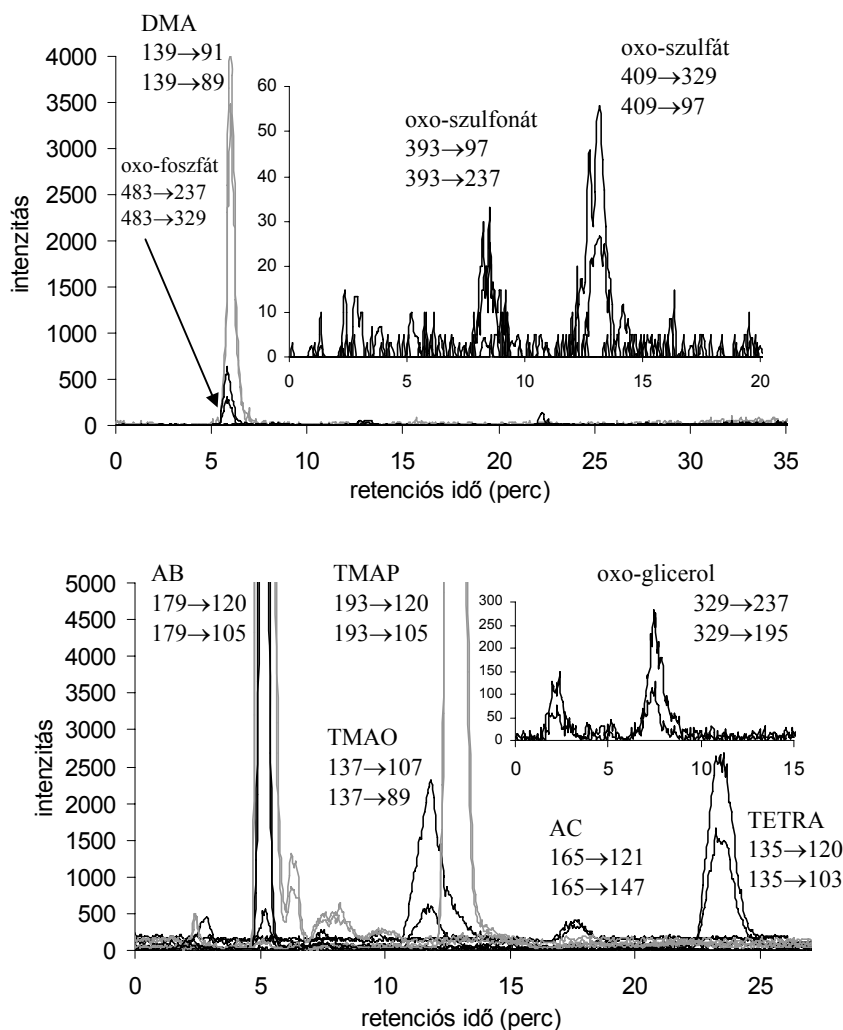
#### 5.2.3.1 Mintaelőkészítés

A teljes arzéntartalom meghatározást már korábban elvégeztem, így roncsolásos mintaelőkészítést ebben az esetben már nem alkalmaztam. Az arzénkomponensek kinyeréséhez minden minta esetében ugyanazt az eljárást alkalmaztam, amelyet korábban az ICPMS vizsgálatok során. A vizsgálatokhoz minden esetben három párhuzamos extrakciót végeztem. A TORT-2 hiteles anyagmintánál, illetve a kagyló- és halmintáknál az **5.2.2.2 fejezetben** leírt mintaelőkészítést hajtottam végre. A tengeri algaminta Madsen és munkatársai által tisztított és vizsgált alga extraktum volt (MADSEN, 2000). A mérés előtt a bepárolt extraktumhoz 1 ml ioncserélt vizet adtam és homogenizáltam.

#### 5.2.3.2 Arzénmódosulatok minőségi vizsgálata HPLC-ESMS/MS módszerrel

A vizsgálatokat minden esetben MRM módban végeztem el az **5.1.3 fejezetben** optimált paraméterek beállítása mellett. A módosulatok meghatározására anion- és kationcserés kromatográfiát alkalmaztam, mely során minden arzénkomponens esetében a két legjellemzőbb és legintenzívebb átmenetet monitoroztam. A **TORT-2 CRM** esetében az irodalmi adatokkal megegyezően DMA<sup>V</sup>-t, AB-t, TMAP-t, AC-t, TETRA-t, oxo-arzenocukor-foszfátot és -szulfonátot egyaránt sikerült kimutatnom. Vahlen és munkatársai 0.093 ± 0.069 mg As/kg mennyiségben MA<sup>V</sup>-t is találtak, melyet azonban a magas kimutatási határ miatt nem tudtam kimutatni. Továbbá az említett oxo-arzenocukrok mellett a másik két oxo-arzenocukrot (-glicerol

és -szulfát), illetve TMAO-t is azonosítottam. Ezeket a komponenseket az ICPMS-sel történő detektálás során feltehetően a nem megfelelő elválasztás miatt nem tudták kimutatni. A minta két jellemző kromatogramja a **35. ábrán** látható. A TMAO és a TMAP ugyanis hasonló retenciós viselkedést mutat kationcserés kromatográfia esetén, továbbá a nagy mennyiségben jelen levő AB szintén eltakarta a hozzá közel eluálódó oxo-glicerol csúcsát. Ezzel szemben az átmenetek szelektív monitorozása miatt az ESMS/MS detektálás MRM módban nem követeli meg a komponensek teljes elválasztását, lehetővé téve ezzel a koeluálódó komponensek azonosítását.

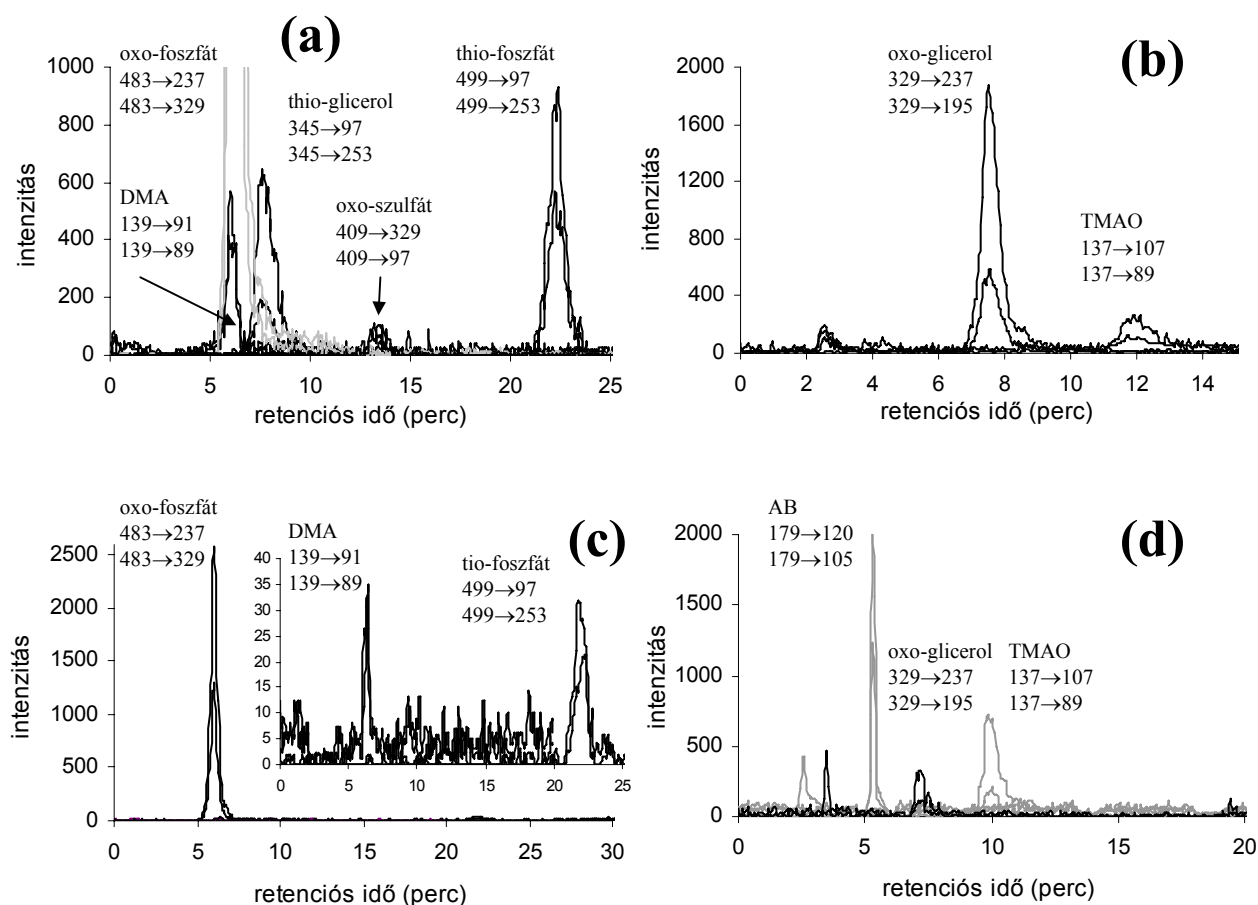


**35. ábra** TORT-2 CRM HPLC-ESMS/MS anioncserés (fent) és kationcserés (lent) kromatogramja

Az édesvízi kagylók HPLC-ESMS/MS kromatogramjai a **36. ábrán** láthatók. A HPLC-ICPMS vizsgálatokkal megegyezően oxo- és tio-arzenocukor-glicerolt, valamint oxo- és tio-arzenocukor-foszfátot detektáltam a legnagyobb mennyiségben. Emellett DMA<sup>V</sup>, oxo-szulfát és TMAO is kimutatható volt a mintákban. A HPLC-ICPMS vizsgálatok során feltehetően az



anioncserés oszlopon a holtterfoggal eluálódó nagy mennyiségű oxo-glicerol tehető felelőssé azért, hogy a kismértékben visszatartott DMA<sup>V</sup> a koelúció miatt nem volt detektálható. Az édesvízi halminta esetében a korábban detektált arzénmódosulatok mellett kisebb mennyiségben szintén detektáltam DMA<sup>V</sup>-t és TMAO-t (**36. ábra**). Ebben az esetben nem a koelúció, hanem a kimutatási határok közötti különbségeknek köszönhető a további két speciesz azonosíthatósága a halmintákban. HPLC-ICPMS vizsgálatokkal kimutatták, hogy a tengeri alga mind a négy oxo-arzenocukrot tartalmazza, melyeket HPLC-ESMS/MS-sel szintén azonosítottam. További arzénmódosulatokat ebben az esetben nem sikerült kimutatnom.



**36. ábra** Édesvízi kagyló anioncserés (a) és kationcserés (b) kromatogramjai, illetve az édesvízi hal anioncserés (c) és kationcserés (d) kromatogramjai

A fent bemutatott példák alapján elmondhatom, hogy az általam kidolgozott HPLC-ESMS/MS módszer alkalmas különböző környezeti minták szerves arzénmódosulatainak meghatározására. Továbbá a komponensek szelektív monitorozása és az alacsonyabb kimutatási határok lehetővé tették az ICPMS-sel nem kimutatható komponensek detektálását. A módszer előnye, hogy az azonosításhoz nincs szükség standard oldatokra.

### 5.2.3.3 Minőségi vizsgálatok minőségbiztosítása HPLC-ESMS/MS esetén

A molekulaszелеktív ESMS/MS detektálás minőségbiztosítása az elemszelektív detektálási módszereknél bemutatott lépéseken túl további lehetőségeket rejt magában. Munkám során négy különböző módon győződtem meg az arzénkomponensek azonosításának helyességéről. Először is jól bevált gyakorlat az arzénmódosulatok retenciós idejének összehasonlítása standard és minta oldatok esetén. Azonban a nagy mátrixhatás miatt a specieszek sikeres azonosítása érdekében ez a módszer nagy elővigyázatosságot igényel. Egy másik ismert eljárás a csúcsok azonosítására az úgynevezett spike-olás, mely során a mintában feltételezett komponens standard oldatából hozzáadunk a mintához. Ez az eljárás azonban még mindig nem bizonyítja, hogy a mintaoldal esetén az adott átmenetre kapott csúcs a vizsgált komponensből származik és nem valamilyen mátrixhatás eredménye. A HPLC-ESMS/MS módszer kidolgozásakor és az előző fejezetben is bemutattam, hogy minden komponens esetében a két legjellemzőbb illetve legintenzívebb anyaiion→fragmension átmenetet monitoroztam. Amennyiben a várt retenciós időnél csak az egyik átmenet jelenik meg, biztos, hogy a detektált jel nem a vizsgált komponensből, hanem a minta egyéb mátrixkomponenseiből származik. Az átmenetek szelektivitásának köszönhetően az abból eredő hibalehetőség, hogy a kívánt retenciónál mindkét átmenet megjelenik és egyik sem az általunk vizsgált komponensből származik, minimális. Továbbá, ha megvizsgáljuk a két átmenethez tartozó csúcs alatti területek arányát, azt tapasztaljuk, hogy ez az érték a mért koncentrációtól független. Tehát ha a retenciós idők egyezésén túl a mintában mért arzénkomponensek átmeneteinek aránya megegyezik a standard oldatok esetében meghatározott értékkel, a komponensek azonosítása sikeres. A **15. táblázatban** a standard vegyületek és a vizsgált mintában található arzénkomponensek retenciós idejét és az átmenetek arányát hasonlítottam össze.

A negyedik minőségbiztosítási módszer a tömegspektrométer egyik mérési módján alapszik. Ez az úgynevezett IDA módszer, mely az angol Information Dependent Acquisition szó rövidítése. A vizsgálat során az előzőekhez hasonlóan MRM módban monitorozzuk a kívánt anyaiion→fragmension átmeneteket. Azonban ha az egyik átmenetre jelet kapunk, a készülék átvált EPI módba, mely során az anyaiiont három különböző energián fragmentálva regisztrálja a keletkezett fragmensionok tömegspektrumait, melyek ujjlenyomatszerűen minden egyes molekula esetében egyediek és nagyon jól jellemzik azt. A standard vegyület három energián felvett EPI spektrumával összehasonlítva a minta esetén kapott EPI spektrumokat leellenőrizhetjük, hogy valóban a kívánt molekulát detektáltuk.

**15. táblázat** A retenciós idők és az átmenetek arányának összehasonlítása

	Standard		Tort-2		Édesvízi kagyló		Édesvízi hal		Tengeri alga	
	átmenet arányok	t <sub>R</sub> perc	átmenet arányok	t <sub>R</sub> perc	átmenet arányok	t <sub>R</sub> perc	átmenet arányok	t <sub>R</sub> perc	átmenet arányok	t <sub>R</sub> perc
DMA	1.25	6.1	1.21	6.0	1.12	6.0	1.06	6.3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
oxo-foszfát	2.26	6.0	2.05	5.8	2.22	6.1	2.04	6.0	2.12	6.2
oxo-glicerol	3.23	7.7	2.64	7.5	2.97	7.5	2.4	7.4	3.33	7.8
oxo-szulfonát	1.06	8.5	1.17	8.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1.06	8.5
oxo-szulfát	1.88	13.2	1.65	13.4	1.43	13.4	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1.88	13.2
tio-foszfát	1.81	22.5	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1.68	22.3	1.54	22.3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
tio-glicerol	3.25	8.1	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	3.32	7.7	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
AB	1.60	5.46	1.61	5.29	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1.69	5.3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
TMAP	1.44	13.2	1.43	12.8	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
TMAO	3.84	12.1	3.47	11.8	2.12	12	4.04	11.8	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
AC	1.79	18.3	1.27	17.9	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
TETRA	1.83	24.1	1.7	23.7	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

### 5.2.3.4 Arzénmódosulatok mennyiségi vizsgálata HPLC-ESMS/MS módszerrel

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az ionizációs hatásfokot a mintamátrix nagymértékben viaszoríthatja, megnehezítve ezzel a pontos mennyiségi elemzést. Ezért a mennyiségi meghatározás már nem olyan könnyen megvalósítható ESI ionforrás mellett, mint az ICP-MS esetében. Az erős mátrixhatás kiküszöbölésére az általános gyakorlat többféle módszert használ. Egyrészt törekedni kell a komponensek megfelelő visszatartására, mely által a mátrixionok elkülöníthetők a vizsgálandó molekuláktól. A leggyakrabban alkalmazott fordított fázisú elválasztásnál ez a folyamat könnyen megvalósítható, hiszen a zavaró sók (ionok) könnyen elkülöníthetők az erősen visszatartott apoláris komponensektől. Esetemben az ioncserés kromatográfia nem hordozza ezeket az előnyöket, ezért az elválasztástechnikai módszerek kidolgozása során a komponensek lehető legjobb visszatartására törekedtem. Az **5.1.3.2** és **5.1.3.3** fejezetekben bemutatott standard kromatogramokon látható, hogy a legkorábban eluálódó komponensek is kellő mértékben elválnak a holtterefogattól.

A megfelelő visszatartás azonban nem mindig bizonyul elégségesnek a mátrixhatás kiküszöbölésére. További lehetőség a minták előzetes tisztítása off-line, vagy még gyakrabban on-line kromatográfiás módszerekkel. Az arzénspeciációs gyakorlatban többször találkozhatunk ilyen tisztítási lépésekkel, melyek hatásfokát ez idáig nem vizsgálták (MCSHEEHY, 2002). Munkám során megvizsgáltam, hogy a mintamátrix milyen módon befolyásolja az egyes komponensek mennyiségi meghatározását. Ehhez viszonylag egyszerű mintatisztítási eljárásokat és kalibrációs módszereket alkalmaztam a TORT-2 CRM-re, mely arzénmódosulatait HPLC-

ICPMS-sel korábban már meghatározták (WAHLEN, 2004). Legelső lépésben megvizsgáltam, hogy a kifejlesztett kromatográfiás módszer milyen hatékonysággal képes elválasztani a vizsgálandó arzénmódosulatokat a mintamátrix egyéb komponenseitől. Mivel a mátrix jelcsökkentő hatása révén meghamisíthatja a külső kalibrációval kapott eredményeket, a minta arzénmódosulatainak mennyiségét standard addíciós kalibrációval is meghatároztam. A két kalibrációs módszer eredményeit a **16. táblázatban** tüntettem fel. A TETRA, TMAO, AC, TMAP és oxo-glicerol esetében nincs szignifikáns eltérés a két különböző kalibrációval kapott eredmények között. Mint ahogy azt a minőségi meghatározásnál már említettem, a korábbi ICPMS vizsgálatok sem TMAO-t, sem oxo-glicerolt nem mutattak ki a mintából. Ezzel szemben a HPLC-ICPMS-sel mért AC mennyisége jóval magasabb volt. Ez alátámasztja azt a feltételezésemet, hogy a TMAO a komponensek koelúciója miatt nem detektálható HPLC-ICPMS technikával (**16. táblázat**), és a detektált komponens legnagyobb része nem AC, hanem TMAO volt. A korán eluálódó arzénmódosulatok esetében - úgy, mint DMA<sup>V</sup>, AB, oxo-foszfát - különbség van a külső kalibráció és a standard addíciós kalibráció között (**16. táblázat**). Legkifejezettebb a hatás az AB esetében, ahol egy nagyságrendnyi a különbség. Azonban a DMA<sup>V</sup> és az AB esetében a mátrix okozta jelcsökkenés standard addíció alkalmazásával kompenzálható, míg az oxo-foszfát cukor esetében a HPLC-ICPMS eredmények nagy szórása miatt az adatok összehasonlítása nem lehetséges.

**16. táblázat** TORT-2 hitelesített anyagminta arzénmódosulatainak mennyiségi meghatározása különböző kalibrációs módszerek és mintatisztítási eljárások alkalmazásával

	Kalibrációs módszerek			Kromatográfiás mintatisztítási módszerek		
	HPLC-ICPMS Vahlen et al.	Külső kalibráció	Standard addíció	Méretkizárásos oszlop (off-line)*	Fordított fázisú előtét oszlop (on-line)*	Ellentétes töltésű ioncserés előtét oszlop (on-line)*
	$\mu\text{g As kg}^{-1}$			$\mu\text{g As kg}^{-1}$		
TETRA	44 ± 8.8	41.1 ± 3.2	46.9 ± 2.8	37.3 ± 4.7	45.2 ± 3.1	42.3 ± 2.9
TMAO	n.d.***	45.7 ± 2.7	51.4 ± 2.3	48.2 ± 4.4	45.5 ± 4.2	46.8 ± 3.3
AC	43 ± 9.8	6.94 ± 0.8	9.35 ± 1.6	6.25 ± 0.9	7.08 ± 0.8	6.91 ± 0.9
AB	14250 ± 997	907 ± 76	13800 ± 620	1160 ± 95	818 ± 69	856 ± 58
TMAP	836 ± 72	834 ± 37	1120 ± 82	894 ± 81	813 ± 63	639 ± 46
oxo-glicerol	n.d.***	294 ± 19	301 ± 21	290 ± 28	264 ± 17	217 ± 14
DMA <sup>V</sup>	840 ± 100	313 ± 13	928 ± 44	341 ± 25	304 ± 20	248 ± 19
oxo-foszfát	231 ± 150	14.2 ± 1.3	35.7 ± 3.2	12.4 ± 0.8	13.3 ± 0.9	12.6 ± 1.1
oxo-szulfonát	22.5 ± 7	n.kv.**	n.kv.**	n.kv.**	n.kv.**	n.kv.**

\* külső kalibrációval meghatározva

\*\* detektáltam, de a rendelkezésemre álló standard oldat kis mennyisége miatt nem kvantifikáltam

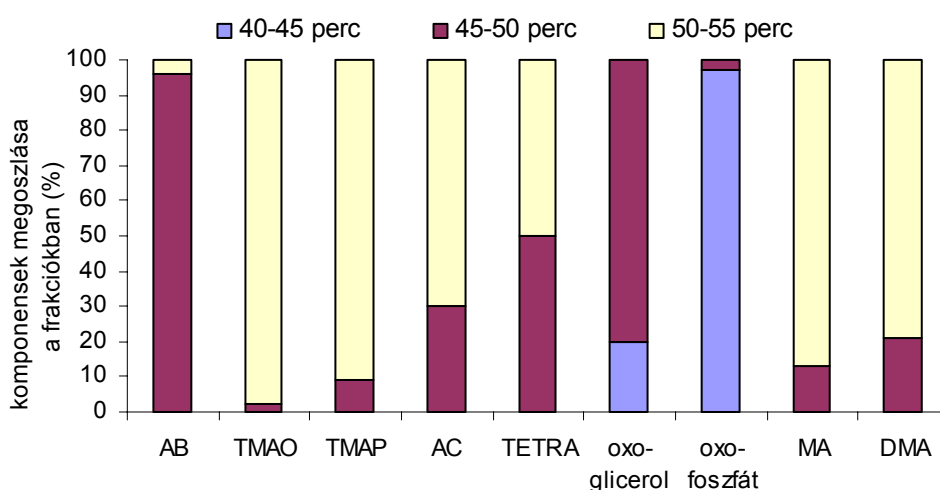
\*\*\* Vahlen és munkatársai nem detektálták ezeket a módosulatokat

A fenti táblázatból látható, hogy a standard addíciós kalibráció alkalmazásával a mátrix okozta jelcsökkenés kiküszöbölhető. Azonban nagyszámú minta rutin elemzése esetén ez a bonyolult és időigényes kalibráció a vizsgálati módszer hátrányává válhat. Ezért a mátrix ionizációra gyakorolt hatásának csökkentése céljából különböző on-line és off-line mintatisztítási módszereket vizsgáltam meg. Tisztításhoz a legnépszerűbbek a szemipreparatív kromatográfiás technikák, melyeket, ha egymás után alkalmazzuk, más-más fizikai-kémiai folyamatok alapján választhatjuk el a mérendő alkotókat a mátrixtól. A mintatisztítási módszerek kiválasztása során az alábbi szempontokat vettem figyelembe. A mátrixhatást több különféle molekula jelenléte okozhatja: (i) ezek lehetnek nagy molekulatömegű fehérjék vagy poliszaharidok; (ii) kis molekulatömegű apoláris vegyületek, mint például a zsírok; és (iii) kis molekulatömegű poláros anyagok, ionok és sók. Az első esetben a méretkizárásos kromatográfia hatékony eszköz lehet a nagy molekulák elválasztására a vizsgált arzénkomponensektől. A második esetben egy fordított fázisú elötétoszlopon megfelelő mozgófázissal visszatarthatók az apoláris komponensek. Mivel az arzénkomponensek anionos/kationos formában vannak jelen a HPLC-s vizsgálatok során, a harmadik esetben az ionos komponensek ellentétes töltésű elötétoszlopokkal visszatarthatókká válnak. Ez azt jelenti, hogy kationcserés elválasztás során anioncserés elötétoszlopot, míg anioncserés elválasztás esetén kationcserés elötétoszlopot használunk. Munkám során a fent említett három tisztítási eljárást hasonlítottam össze.

Elsőként egy méretkizárásos tisztítást alkalmaztam, melyre az jellemző, hogy a nagy molekulákat visszatartja, a kis molekulák viszont az oszlop holtterefogatával, nagy retenciós idővel hagyják el az oszlopot. A méretkizárásos kromatográfia (Size Exclusion Chromatography, SEC) csak off-line módban volt alkalmazható, mivel a maximálisan megengedett nyomás nem tette lehetővé a 0.4 ml/percnél nagyobb áramlási sebesség használatát. A mintatisztítás elvégzése előtt standard oldatok segítségével (100 ng/ml AB, AC, TMAO, TMAP, TETRA, MA<sup>V</sup>, DMA<sup>V</sup>, oxo-glicerol és oxo-foszfát) felvettem az arzénkomponensek elúciós profilját. Szemipreparatív célok miatt érdemes minél nagyobb mintatérfogatot injektálni a kolonnára, valamint olyan mozgófázist alkalmazni, mely a mintafrakció legyűjtése után liofilezéssel könnyen elillan. A fent említettek miatt készítettem egy 350 µl-es mintabevivő hurkot, és eluensnek a 20 %-os MeOH-t használtam. Áramlási sebességnek 0.4 ml/percet állítottam be. Az oszlopot elhagyó frakciókat a következő időintervallumokban gyűjtöttem: 0-30 perc, 30-35 perc, 35-40 perc, 40-45 perc, 45-50 perc, 50-55 perc, 55-60 perc, 60-65 perc (az oszlop holtideje 62.5 perc). A frakciókat egyenként flow-injection módban megmérve figyeltem, hogy mely frakciókban eluálódtak az egyes arzénmódosulatok.

Tapasztalataim alapján a permanens kationos komponensek (AC és TETRA) sajnos nem moshatók le az oszlopról a 20 % MeOH tartalmú eluenssel. Feltételeztem, hogy az állófázis és a

kationos komponensek között egy kémiai interakció (ionos kötés) alakul ki, mely következtében a komponensek erősen visszatartódnak. Ezek szerint az állófázis negatívan töltött felületeket tartalmaz. Mivel az állófázis egy poli-dextrán, poli-agaróz polimerizált cukor fázis, feltehetőleg a nem reaktív -OH-csoportok az alkalmazott pH-n (pH=7.4) deprotonálódtak, ezáltal anionos töltésűvé váltak. Emiatt célszerűnek láttam savas kémhatású mozgó fázis alkalmazását. Következő lépésként 20 % MeOH mellett 1% HCOOH-t is tettem az oldatba (pH=2.6 lett), és így a felvitt arzén teljes mennyisége lemoshatóvá vált. **A 37. ábrán** látható, hogy az arzénkomponensek 45-55 perc között eluálódnak az oszlopról. A nagyobb molekulatömegű arzenocukrok egy része valamivel előbb, a 40 perces frakcióban található. A vizsgálatot oxo-szulfonát és -szulfát, valamint tio-arzénmódosulatok esetében a rendelkezésre álló standard oldatok kis mennyisége miatt nem végeztem el. Azonban a molekulatömegüket figyelembe véve feltételeztem, hogy ezek a komponensek is 40-55 perc között jutnak át az oszlopon. A TORT-2 CRM tisztításához szintén 350 µl extraktumot vittem fel a SEC oszlopra, majd egyetlen frakciót gyűjtöttem 40 és 55 perc között. A kapott 6 ml oldatot liofileztem, majd 350 µl ioncserélt vízben visszaoldottam, így további hígítással nem kellett számolnom. A tisztított minta kromatográfiás vizsgálatát a korábbi vizsgálatokkal megegyező módon végeztem el. Az eredményeket a **16. táblázatban** foglaltam össze.



**37. ábra** Arzénkomponensek elúciója SEC tisztítás során

A SEC tisztítás mellett az analitikai oszloppal on-line csatolt, fordított fázisú és ellentétes töltésű előtét oszlopok hatását is megvizsgáltam a mátrixhatás csökkentése érdekében. A mennyiségi kiértékeléshez minden esetben külső kalibrációt alkalmaztam. A **16. táblázatban** a tisztítatlan és tisztított minták eredményeit összehasonlítva megállapítható, hogy egyik

mintatisztítási lépés sem alkalmas a mintamátrix kellő mértékű elválasztásához. Feltehetően nem a nagy méretű molekulák, hanem a kisebb ionok és sók jelenléte a zavaró, melyeket az előtétoszlopokon az elválasztáshoz használt mozgófázissal nem sikerült megfelelő mértékben visszatartani.

#### **5.2.3.5 Következtetések**

Az **5.2.3 fejezetben** bemutatott eredmények alapján elmondható, hogy az általam kifejlesztett HPLC-ESMS/MS módszer alkalmas az arzénmódosulatok minőségi meghatározására környezeti mintákból. A retenciós idő és molekulánként két átmenet egyidejű monitorozása minimálisra csökkenti az arzénkomponensek azonosításában elkövethető hibákat. A kimutatási határ és az ismételhetőség összevethető, sok esetben jobb, mint elemszelektív detektálás esetén. A speciesz szelektív detektálás olyan komponensek azonosítását teszi lehetővé, melyek ICPMS-sel nem voltak kimutathatók. Másrészt az eredményekből világosan látszik, hogy mennyiségi vizsgálatok esetén jelentős hátrány az ionizáció hatékonyságát csökkentő mátrixkomponensek jelenléte a mintákban. A tisztított mintarészlet kromatogramját a tisztítatlan extraktum kromatogramjával összehasonlítva azt tapasztaltam, hogy a mintamátrix - főként a kis retenciós idővel rendelkező komponenseknél - a mennyiségi meghatározást nagymértékben zavarhatja. A tisztítási lépések szignifikánsan nem csökkentették a zavaró hatásokat, ezáltal azok alkalmazása nem ajánlott. Vizsgálataim alapján elmondhatom, hogy a tisztítási módszerek helyett a módosulatok elégséges visszatartása (6-8 perc) célravezetőbb. Amennyiben a komponens kémiai szerkezete ezt nem teszi lehetővé, standard addíciós kalibráció, vagy izotópjelzett módosulat (mint belső standard) használata javasolt.

## 5.2.4 BCR-710 referencia minta arzénmódosulatainak teljes jellemzése

A bevezetőben bemutattam, hogy a biológiai minták arzénspeciációs vizsgálata esetén főként ioncserés vagy fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztást kapcsolnak valamilyen elem vagy molekula szelektív detektorhoz, gyakran hidridképzéses lépés közbeiktatásával. A legáltalánosabban alkalmazott mintaelőkészítési módszerek víz, metanol, vagy a kettő különböző arányú elegyével végzett ráztatásos, mikrohullámú vagy ultrahangos technikák. Azonban az alkalmazott eljárástól függetlenül a módosulatanalitikai vizsgálatok eredményeinek pontosságát ellenőriznünk kell, vagyis minden esetben szükség van a módszer minőségbiztosítására. A korábbi fejezetekben kitértem az anyagmérleg elkészítés fontosságára, illetve felhívtam a figyelmet a kinyerési hatásfok és oszlopviasszanyerési hatásfok közti különbségre. Ezen felül mérésünk pontosságát hiteles anyagmintákkal is ellenőriznünk kell. Annak ellenére, hogy a CRM-ek használata során fontos szempont a vizsgált komponensre is hitelesített megfelelő mátrix kiválasztása, a módosulatanalitika célokra gyártott CRM-ek száma kevés, továbbá a hitelesített érték a teljes arzéntartalomtól kívül csak egy vagy két módosulat esetében van megadva. Ezzel szemben sok esetben akár több mint tíz arzénkomponens is előfordulhat a hitelesített mintákban. Például az egyre nagyobb népszerűségnek örvendő oxo- és tio-arzenocukrok vizsgálata esetén nem találunk olyan CRM-et, melyek ezekre a komponensekre lennének hitelesítve, holott az algákban, kagylókban, sőt az édesvízi élőlényekben is nagy mennyiségben fordulnak elő. Bár a standardok hasznosak a komponensek retenciós idő alapján történő azonosításához, az említett arzenocukor komponensek kereskedelmi forgalomban nem kaphatók, laboratóriumi szintézisük az oxo-glicerol kivételével ez idáig még nem megoldott.

Céljaim közé tartozott egy olyan hitelesített anyagminta arzénkomponenseinek teljes jellemzése a módosulatok eloszlásán keresztül, mely a lehető legtöbb speciest minél nagyobb koncentrációban tartalmazza. Ezért esett a választásom a BCR-710 elnevezésű CRM-re, mely osztriga izomszövetéből készült homogén minta. A minta a teljes arzéntartalomtól felül ( $25.7 \pm 2.7$  mg As/kg) AB-re van hitelesítve ( $13.89 \pm 1.79$  mg As/kg). Látható, hogy az AB a CRM teljes arzéntartalmának csak 54 %-át teszi ki, tehát az összes arzén másik fele valamilyen más arzénmódosulat vagy módosulatok formájában van jelen.

A minta arzén-species mintázatának meghatározása hasznos segítség lehet a komponensek retenciós idő alapján történő azonosításában, ha a vizsgált vegyületek standard formában nem állnak rendelkezésünkre.



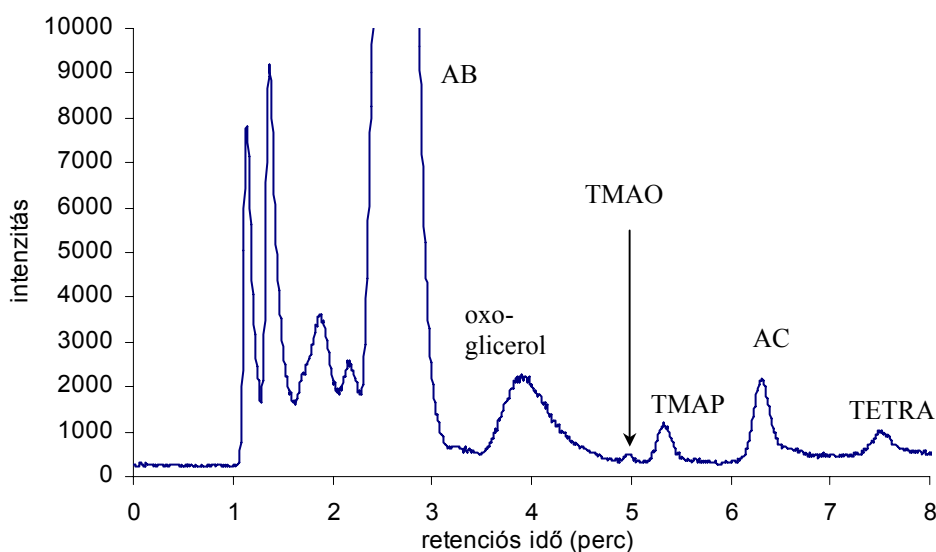
### 5.2.4.1 Mintaelőkészítés

A vizsgálat során teljes arzéntartalom meghatározást és speciációs elemzést egyaránt végeztem. A CRM és az extraktumok teljes arzéntartalmának meghatározásához a mintát az anyag és módszer fejezetben részletezett mikrohullámú roncsolással készítettem elő. A speciációs vizsgálatokhoz a mintából 250 mg-ot mértem be 0.1 mg pontossággal, majd 10 ml extrahálószerrel (metanol, víz, metanol:víz = 1:1) adtam hozzá. Egy éjszakán át rázattam, majd centrifugáltam (4500 fordulat/perc, 20 perc) és szűrtem (0.20 µm). Minden esetben három párhuzamos extrakciót végeztem. Az extraktumok arzénmódosulatait HPLC-ICPMS kapcsolt technikával határoztam meg, mely során az **5.1.2 fejezetben** bemutatott anioncserés és kationcserés elválasztástechnikai módszereket alkalmaztam.

### 5.2.4.2 Eredmények

Az általam mért **teljes arzén** mennyisége 26.5 és 27.1 mg As/kg között volt, mely a hitelesített koncentrációtartományba esik.

A **módosulatanalitikai** eredményeket a **17. táblázatban** foglaltam össze. A kinyerés hatásfokát az extraktum teljes arzéntartalmának és a porminta teljes arzéntartalmának hányadosából számoltam. Az extrakciós hatásfok 70-78 % között ingadozott, a legjobb kinyerést metanol-víz elegyének alkalmazása esetén értem el. A **17. táblázat** negyedik oszlopában argonnal átbuborékolgatott vízzel végzett extrakció eredményeit tüntettem fel. Ennek magyarázatára a későbbiekben térek ki. A mintában 14 arzénmódosulatot detektáltam, melyek közül 12-t sikerült azonosítanom. A minta kationcserés kromatogramján megfigyeltem, hogy a standard komponenshez képest a TMAO fél perccel később eluálódott, ezért a mintához standard TMAO oldatot adagolva ismét felvettem a minta kromatogramját, mely során egy dupla csúcsot kaptam. Ez azt bizonyítja, hogy a mintában detektált csúcs nem TMAO volt. Standard addíciót alkalmazva arra a megállapításra jutottam, hogy a TMAO retenciójához közel TMAP eluálódik. A két komponens megfelelő elválasztásához 10 mM-ra csökkentettem a mozgófázis ionerősségét. A minta kationcserés elválasztását a **38. ábra** mutatja. A kisebb ionerősség hatására a TMAO és a TMAP kellően elváltak egymástól, azonban a kromatogram ideje 5 percről 8 percre növekedett. A fent említett két komponens mellett AB-t (71.5 %), oxo-glicerolt (5.1 %), AC-t (2.2 %) és TETRA-t (0.7 %) szintén sikerült szelektíven meghatároznom a kationcserélő oszlopon. A hitelesített értékkel összevetve, az általam meghatározott AB koncentrációja ( $14.57 \pm 0.44$  mg As/kg) összhangban volt.



38. ábra BCR-710 CRM kationcserés kromatogramja (10 mM piridin-formiát esetén)

17. táblázat BCR-710 CRM arzénmódosulatainak mennyisége különböző kinyerés esetén

Arzénmódosulatok	Koncentráció (mg As/kg szárazanyag) <sup>a</sup>			
	Extrakció vízzel	Extrakció metanol-víz elegyével	Extrakció metanollal	Extrakció argonnal kezelt vízzel
As(V)	nyomokban	nyomokban	<0.03	nyomokban
MA	nyomokban	<0.03	<0.03	nyomokban
DMA	0.44 ± 0.02	0.54 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.49 ± 0.03
AB	13.96 ± 0.76	14.48 ± 0.45	14.83 ± 0.57	14.97 ± 0.66
AB2	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01
AC	0.42 ± 0.03	0.39 ± 0.04	0.31 ± 0.02	0.39 ± 0.02
TMAO	nyomokban	nyomokban	nyomokban	nyomokban
TETRA	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01
oxo-glicerol	0.99 ± 0.07	0.97 ± 0.06	0.33 ± 0.03	1.00 ± 0.11
oxo-foszfát	1.23 ± 0.08	1.22 ± 0.15	0.29 ± 0.02	1.26 ± 0.03
tio-glicerol	0.65 ± 0.04	0.69 ± 0.03	1.23 ± 0.08	0.67 ± 0.03
tio-foszfát	0.76 ± 0.03	0.79 ± 0.04	1.46 ± 0.09	0.84 ± 0.04
ismeretlen U1	0.56 ± 0.04	0.79 ± 0.05	n.d.	0.48 ± 0.02
ismeretlen U2	0.11 ± 0.01	0.097 ± 0.039	n.d.	0.13 ± 0.01
specieszek összege	19.5 ± 0.8	20.3 ± 0.9	19.1 ± 0.7	20.5 ± 0.5
összes arzén az extraktumban	18.7 ± 1.1	20.9 ± 0.7	19.5 ± 1.6	19.4 ± 0.8
kinyerési hatások	70%	78%	73%	73%

A 17. táblázatból látható, hogy az oxo-glicerol kivételével az egyes kationos arzénkomponensek mennyisége az extraktumban független az extrakció során alkalmazott oldószertől. Ezzel szemben az anionos komponensek kinyerési hatékonysága láthatóan oldószerfüggő. Arzenát és MA<sup>V</sup> csak nyomokban található a mintában, azonban a metanollal

végzett extrakció során egyiket sem sikerült kimutatnom. Az oxo- és tio-arzenocukrok minden esetben jelen voltak az extraktumban, azonban érdekes megfigyelés, hogy arányuk a mintában az alkalmazott oldószer függvényében változott. Az oxo-arzenocukor analógok koncentrációja a vizes extraktumban nagyobb, míg a tio-arzenocukrok mennyisége metanolos extrakció során növekedett meg. Ha jobban megvizsgáljuk a glicerol- és foszfát-arzenocukrokat, látható, hogy az oxo- és tio-arzenocukrok összege vizes és metanolos extrakció esetén megegyezik. Ez arra enged következtetni, hogy a vízzel végzett extrakció alatt a tio-arzenocukrok egy része oxidálódhatott. Az oxidáció az extraktum tárolása során nem következhetett be, mivel a kinyerést követően a mintákat rögtön mértem. A feltételezett oxidáció bizonyítására az extrakció során olyan ioncserélt vizet alkalmaztam, melyből az oldott oxigént argon gázzal kihajtottam. Az eredményeket szintén a **17. táblázatban** mutatom be. Látható, hogy az argonnal kezelt víz esetén a hagyományos vizes extrakcióval megegyező eredményeket kaptam. Ez azt mutatja, hogy az oxo- és tio-arzenocukrok kinyerése nagymértékben függ az alkalmazott extrahálószerektől. Míg az oxo-arzenocukor komponensek vízben oldódnak jobban, addig a tio-arzenocukrok metanollal nyerhetők ki nagyobb hatásokkal.

Az anyagmérleg alapján elmondhatom, hogy az extrakció során kinyert arzén teljes mennyiségét sikerült meghatároznom, mivel a komponensek mennyiségének összege minden esetben megegyezik az extraktum teljes arzéntartalmával. A 14 arzénmódosulatból 12-t azonosítottam. A módosulatanalitikai eredményeket felhasználva a CRM alkalmas lehet standard oldatok hiányában az oxo- és tio-arzenocukrok vizsgálatára környezeti mintákban.



## 6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Nagy hatékonyságú folyadék-kromatográfián alapuló anion- és kationcserés elválasztástechnikai módszereket dolgoztam ki az arzénkomponensek szelektív meghatározására HG-AFS, ICPMS és ESMS/MS detektálási módszerek alkalmazása mellett.
2. Elsőként végeztem arzénspeciációs vizsgálatot Égei-tengerből származó, emberi fogyasztásra alkalmas kagyló- és halmintákon.
  - Kimutattam, hogy a vizsgált szervezetek 5.3-34 mg/kg mennyiségű arzént tartalmaznak.
  - Megállapítottam, hogy a halak esetében a felhalmozott arzénmódosulatok több, mint 90%-a az emberi szervezet számára nem mérgező AB formájában van jelen, míg a kagylók esetében az AB mellett 18-41%-ban arzenocukrokat sikerült kimutatnom.
  - Figyelembe véve a görög lakosság táplálkozási szokásait megállapítottam, hogy a nagy arzénkoncentráció ellenére a térségből származó kagylók és halak fogyasztása nem jelent egészségügyi kockázatot.
3. Meghatároztam az édesvízi tápláléklánc egyes egyedeinek teljes arzéntartalmát, illetve megvizsgáltam a felvett arzénmódosulatok eloszlását.
  - Megállapítottam, hogy a Duna vizének alacsony (1.1 ng/ml) arzénkoncentrációja ellenére az édesvízi algák, növények, kagylók és békák hasonlóan a tengeri fajokhoz nagymértékben képesek az arzént akkumulálni, míg az édesvízi halak teljesarzén-koncentrációja 1-2 nagyságrenddel elmarad a többi vizsgált mintákéhoz képest.
  - Kimutattam, hogy az édesvízi algák hasonlóan a tengeri fajokhoz több mint 90%-ban arzenocukrokat tartalmaznak.
  - A növényekben szinte kizárólag szervesetlen arzenitet ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) és arzenátot ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) találtam.
  - Megállapítottam, hogy a vizsgált édesvízi béka fajban található fő arzénkomponensek a szervesetlen arzenit (30%) és a négyszeresen metilált tetrametil-arzónium-kation (35%). Emellett mindhárom köztes metilált arzénforma (mono-, di-, és trimetil arzénkomponensek) kimutatható, amely arra enged következtetni, hogy a béka önmaga képes a mérgező, szervesetlen arzénmódosulatoskat nem mérgező, négyszeresen metilált komponensekké alakítani.
  - Megállapítottam, hogy ellentétben a tengeri kagylókkal az édesvízi kagylók domináns arzénmódosulatai az arzenocukrok, illetve az eddig csak tengeri szervezetekben

kimutatott tio-arzenocukrok. Arzenobetaint csak nyomokban sikerült kimutatni a vizsgált mintákban.

- Megállapítottam, hogy az édesvízi halak AB-t csak nyomokban tartalmazznak, ezzel szemben a fő komponens az oxo-arzenocukor-foszfát. Kimutattam, hogy a vizsgált halfajok tartalmazhatnak olyan tio-arzenocukrokat, melyeket eddig halakban nem mutattak ki.

4. Új, ESMS/MS detektáláson alapuló csatolt analitikai módszert dolgoztam ki a szerves arzénmódosulatok meghatározására.

- A szerves arzénmódosulatok fragmentációja során felvett termékion tömegspektrum alapján meghatároztam a komponensek detektálásához szükséges optimális komponensfüggő paramétereket.
- Megvalósítottam az oxo- és tio-arzenocukrok egyetlen kromatográfiás módszerrel történő vizsgálatát.
- Megállapítottam, hogy néhány arzénkomponens esetében akár két nagyságrenddel jobb kimutatási határ érhető el, mint az általam alkalmazott elemspecifikus detektálások során.
- Bebizonyítottam, hogy néhány arzénkomponens esetében szükség van azok előzetes kromatográfiás elválasztására az esetleges azonosítási hibák elkerülése érdekében.
- Hiteles anyagminták mérésével igazoltam, hogy az általam kifejlesztett új kapcsolt technika alkalmas az arzénmódosulatok minőségi vizsgálatára standard oldatok használata nélkül.
- Bebizonyítottam, hogy a különböző, kromatográfián alapuló mintatisztítási eljárások nem csökkentik a mintamátrix ionizációra gyakorolt hatását.

5. Elvégeztem egy teljesarzén-tartalomra és AB-re hitelesített referencia minta (BCR-710) jellemzését a benne található arzénkomponensek eloszlása szempontjából.

- Az arzenobetain mellett 11 ismert - köztük 2 oxo- és 2 tio-arzenocukrot - és 2 ismeretlen arzénkomponenst sikerült kimutatnom a mintából.
- Meghatároztam mind a 14 arzénmódosulat mennyiségét a mintában.
- Különböző oldószereket összehasonlítva megállapítottam, hogy míg az oxo-arzenocukrok vizes extrakcióval nyerhetők ki nagyobb hatásfokkal, addig a tio-arzenocukrok kinyerése szerves oldószer alkalmazása esetén hatékonyabb.
- A teljes anyagmérleg elkészítésével bebizonyítottam, hogy a kinyerhető arzén teljes mennyiségét sikerült meghatároznom.

## 7 ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori munkám során különböző elválasztástechnikai és detektálási eljárásokon alapuló csatolt módszereket dolgoztam ki a környezetben leggyakrabban előforduló arzénkomponensek meghatározására különféle környezeti mintákból. A komponensek elválasztását ioncserés kromatográfiával (HPLC) végeztem el, melyhez detektorként atomfluoreszcens spektrométert (AFS), induktív-csatolású-plazma-tömegspektrométert illetve elektroporlasztásos-tandem-tömegspektrométert kapcsoltam.

Munkám első felében a hidridképzésen alapuló HPLC-HG-AFS technika alkalmazhatóságát terjesztettem ki a többszörösen metilált kationos arzénkomponensekre és oxo-arzenocukrokra. Megvizsgáltam az eluensben alkalmazott piridin és a módosulatok oxidációjának elősegítésére használt  $K_2S_2O_8$  jelképzésére gyakorolt hatását. A módszert alkalmazva meghatároztam, hogy az Égei-tengerből származó kagylók és halak 5-30 ppm mennyiségben képesek az arzént felhalmozni, melynek több mint 70-90 %-a nem toxikus arzenobetain formájában van jelen. A kagylóminták az arzenobetain (AB) mellett nagyobb mennyiségben oxo-arzenocukor módosulatokat is tartalmaztak. A görög lakosság táplálkozási szokásait és az elviselhető napi arzénbevitt figyelembe véve elmondható, hogy ezen tengeri élelmiszerek fogyasztása nem jár egészségkárosító hatással.

A HPLC-ICPMS vizsgálatok során az oxo-arzenocukrok mellett a tio-arzén komponensek elválasztását is megoldottam, mely során a meglévő ioncserés módszerek mellett egy további anioncserés elválasztást is alkalmaztam. A kapcsolt technikával édesvízi tápláléklánc egyedeinek arzénspeciációs vizsgálatát végeztem el. A tengeri szervezetekkel összehasonlítva az édesvízi algák és kagylók hasonló mértékben, míg a halak kisebb mértékben képesek az arzént akkumulálni. Az algák fő arzénkomponensei az oxo-arzenocukrok voltak. Azonban a tengeri környezetben domináns AB csak nyomokban volt megtalálható a vizsgált édesvízi kagyló- és halmintákban. Ebben az esetben a fő arzénkomponensek szintén az oxo- és tio-arzenocukrok voltak.

Az elemszelektív detektálás mellett, egy új, molekulaszzelektív detektáláson alapuló módosulatanalitikai módszert (HPLC-ESMS/MS) dolgoztam ki az arzénkomponensek meghatározására. A módszerkidolgozás során az ionforrás paramétereit és komponensfüggő paramétereit egyaránt optimalám. Az elektroporlasztásos ionizáció miatt a kromatográfiához eddig alkalmazott puffereket illékony pufferekkel váltottam fel és megoldottam az oxo- és tio-arzenocukrok egy módszerrel történő elválasztását. Az elem szelektív detektáláson alapuló módszerekkel összehasonlítva egy nagyságrenddel jobb kimutatási határt sikerült elérnem. A módszer alkalmazhatóságát néhány korábban, HPLC-ICPMS-sel vizsgált tengeri és édesvízi

minták meghatározásával bizonyítottam, mely során ICPMS-sel nem detektált komponensek jelenlétét is sikerült kimutatnom. A mennyiségi meghatározások során bebizonyosodott, hogy a korán eluálódó komponensek esetében fellépő mátrixhatás többdimenziós kromatográfiás módszerekkel nem kiküszöbölhető. Az egyetlen megoldásnak a standard addíciós kalibráció bizonyult.

Elvégeztem egy AB-re hitelesített CRM (BCR-710) jellemzését. Összehasonlítottam a különböző metanoltartalmú oldószerrel végzett extrakciók hatásfokát, továbbá meghatároztam a mintában található arzénkomponensek minőségét és mennyiségét. A mintában 12 azonosított és 2 azonosítatlan komponenst detektáltam, továbbá kimutattam, hogy az oxo- és tio-arzenocukrok aránya a mintában az extrahálószer metanoltartalmának függvénye. A módosulatanalitikai eredményeket felhasználva, standard oldatok hiányában a CRM alkalmas lehet az oxo- és tio-arzenocukrok vizsgálatára környezeti mintákban.

A munkám során nagy figyelmet fordítottam a méréseim minőségbiztosítására. Ehhez minden esetben a mintákkal együtt teljes arzéntartalomra és AB-re hitelesített CRM-et használtam, továbbá minden esetben elkészítettem a teljes anyagmérleget. A HPLC-ESMS/MS vizsgálatok esetén két átmenet egyidejű monitorozásával és azok arányának figyelembevételével győződtem meg a minőségi vizsgálatok helyességéről. Az édesvízi minták esetében az alacsony kinyerési hatásfok mellett a kinyert arzénnek csak egy részét tudtam kromatográfiásan meghatározni. Ez bizonyítja, hogy az extrakciós hatásfok és az oszlopvisszanyerési hatásfok nem azonos, ugyanis a kromatográfiásan meghatározott komponensek összegének aránya a teljes arzéntartalomhoz képest nem feltétlenül egyenlő a kinyerés hatásfokával. A két különböző érték meghatározása során körültekintően kell eljárni.



## 8 SUMMARY

In the frame of my Ph.D. study different type of coupled methods were developed for the determination of inorganic and organic arsenic compounds occurring in the aquatic environment. The separation of the arsenic species was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) while the detection was carried out using atomic fluorescence spectrometer (AFS), inductively coupled plasma mass spectrometer (ICPMS) and electrospray tandem mass spectrometer (ESMS/MS).

In the first part of my work an HPLC-HG-AFS coupled method was developed for separation and detection of twelve arsenic compounds including the oxo-arsenosugar compounds. The twelve arsenicals were separated and determined on the basis of their difference in two properties: (i) the pKa values and (ii) hydride generation capacity. The separation was carried out both with an anion- and a cation-exchange column, with and without photo-oxidation. In all the samples arsenobetaine (AB) was detected as the major compound (70-90%), with trace amounts of arsenite ( $\text{As}^{\text{III}}$ ), dimethylarsinic acid ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) and arsenocholine (AC), also present. Arsenosugars were detected only in the mussel samples. Taking into consideration the speciation results, where it was proved that about 90% of the incorporated arsenic is nontoxic arsenobetaine, it can be concluded safely that there is no risk posed by the consumption of seafood originating from the Aegean Sea.

Beside the oxo-arsenosugars the separation and detection of the thio-arsenosugar analogues were also achieved by HPLC-ICPMS. Total arsenic and arsenic species were determined in a range of freshwater samples, collected from the river Danube in Hungary. The dominating arsenic species in the extracts of freshwater algae were arsenosugars, whereas arsenate was present only as a minor constituent. On the other hand, plant extracts contained only inorganic arsenic. The oxo-arsenosugar-phosphate and the oxo-arsenosugar-glycerol as well as their thio-analogues were found in the mussel and fish extracts, while arsenobetaine (AB) was present as a minor species only. Collectively, the data indicate that arsenobetaine, the major arsenical in marine animals, is virtually absent in the freshwater animals investigated, and this represents the major difference in arsenic speciation between the two groups of organisms.

A new speciation method based on molecular selective detection was developed for the determination of 15 organoarsenic compounds. The results demonstrate that the developed HPLC-ESMS/MS methods are powerful approaches for the identification of organoarsenic species in crude sample extracts. The detection limits, linearity as well as reproducibility for most of the species are comparable or even better than those measured by the HPLC-ICPMS technique. The qualitative analysis of the extracts shows that the developed methods allow for

the identification of arsenicals, which were not detectable by ICPMS. It was also demonstrated that the signal suppression caused by matrix effects means a significant limitation in the quantification of arsenicals by ESMS/MS detection. This drawback is manifested especially in the case of the slightly retained species. The three sample-cleanup chromatographic methods including off-line size-exclusion, on-line reversed-phase and on-line oppositely charged ion-exchange approaches proved to be ineffective for separation of the signal-suppressive matrix from the analytes. The standard addition calibration seems to be a suitable solution for such problems.

Characterization of a certified reference material (CRM) called BCR-710 was performed, by HPLC-ICPMS. Three extraction methods (extraction with water, methanol-water 1:1 and methanol) were applied for extraction of arsenic species. Beside AB, 13 minor arsenic compounds including two unknown species were quantified. On the other hand the extractability of some arsenic species depended on the applied extraction method. Oxo-arsenosugars are more water soluble, while in the case of thio-arsenosugars higher extraction efficiency was achieved with methanol. Although the used extractant affects the extracted amount of arsenic species the results can provide useful information for identification of arsenic compounds in biological samples by retention time using BCR-710.

Finally quality control was carried out at each stage of the analysis. In all cases a reference material certified for AB was also measured together with the samples and mass balance was calculated to investigate possible reasons for the low overall recovery of arsenic species. It is often informative to quote the quantities of the various arsenic species detected as a percentage of total arsenic in the extract. I believe that on balance this approach provides the most informative picture of the arsenic speciation pattern in the extracts. In the case of HPLC-ESMS/MS monitoring the retention time together with the two parent ion→fragment ion transitions for each analytes minimize the potential for arsenic species misidentification.

## 9 IRODALOMJEGYZÉK

- 10/2000. (VI. 2.) KöM-EüM-FVM-KHVM együttes rendelet a felszín alatti víz és a földtani közeg minőségi védelméhez szükséges határértékekről.
- ABEDIN M.J., CRESSER M.S., MEHARG A.A., FELDMANN J., COTTER-HOWELLS J., (2002): Arsenic accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science & Technology*, **36**, 962-968.
- ACKLEY K.L., B'HYMER C., SUTTON K.L., CARUSO J.A., (1999): Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **14**, 845-850.
- AL RMALLI S.W., HARIS P.I., HARRINGTON C.F., AYUB M., (2005): A survey of arsenic in foodstuffs on sale in the United Kingdom and imported from Bangladesh. *Science of the Total Environment*, **337**, 23-30.
- ANDREA M.O., (1978): Distribution and Speciation of Arsenic in Natural-Waters and Some Marine-Algae. *Deep-Sea Research*, **25**, 391-402.
- B'HYMER C., CARUSO J.A., (2002): Evaluation of HPLC systems for the separation and quantification of arsenic compounds from apple extracts. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **25**, 639-653.
- BEAUCHEMIN D., BEDNAS M.E., BERMAN S.S., MCLAREN J.W., SIU K.W.M., et al., (1988): Identification and Quantitation of Arsenic Species in a Dogfish Muscle Reference Material for Trace-Elements. *Analytical Chemistry*, **60**, 2209-2212.
- BOHARI Y., LOBOS G., PINOCHET H., PANNIER F., ASTRUC A., et al., (2002): Speciation of arsenic in plants by HPLC-HG-AFS: extraction optimisation on CRM materials and application to cultivated samples. *Journal of Environmental Monitoring*, **4**, 596-602.
- BRAMAN R.S., FOREBACK C.C., (1973): Methylated forms of arsenic in the environment. *Science*, **182**, 1247-1249.
- BROWN R.M., NEWTON D., PICKFORD C.J., SHERLOCK J.C., (1990): Human Metabolism of Arsenobetaine Ingested with Fish. *Human & Experimental Toxicology*, **9**, 41-46.
- CARUSO J.A., HEITKEMPER D.T., B'HYMER C., (2001): An evaluation of extraction techniques for arsenic species from freeze-dried apple samples. *Analyst*, **126**, 136-140.
- CHAPMAN A.C., (1926): The presence of compounds of arsenic in marine crustaceans and shell fish. *Analyst*, **51**, 548-563.
- CHATTERJEE A., (2000): Determination of total cationic and total anionic arsenic species in oyster tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS. *Talanta*, **51**, 303-314.
- CHEN C.Y., FOLT C.L., (2000): Bioaccumulation and diminution of arsenic and lead in a freshwater food web. *Environmental Science & Technology*, **34**, 3878-3884.
- CLOWES L.A., FRANCESCONI K.A., (2004): Uptake and elimination of arsenobetaine by the mussel *Mytilus edulis* is related to salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, **137**, 35-42.
- CORR J.J., LARSEN E.H., (1996): Arsenic speciation by liquid chromatography coupled with ionspray tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **11**, 1215-1224.
- CULLEN W.R., REIMER K.J., (1989): Arsenic Speciation in the Environment. *Chemical Reviews*, **89**, 713-764.
- DAGNAC T., PADRO A., RUBIO R., RAURET G., (1999): Speciation of arsenic in mussels by the coupled system liquid chromatography UV irradiation hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, **48**, 763-772.
- DEL RAZO L.M., STYBO M., CULLEN W.R., THOMAS D.J., (2001): Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **174**, 282-293.

- EBDON L., FISHER A., ROBERTS N.B., YAQOOB M., (1999): Determination of organoarsenic species in blood plasma by HPLC-ICP MS. *Applied Organometallic Chemistry*, **13**, 183-187.
- EDMONDS J.S., FRANCESCONI K.A., CANNON J.R., RASTON C.L., SKELTON B.W., et al., (1977): Isolation, Crystal-Structure and Synthesis of Arsenobetaine, Arsenical Constituent of Western Rock Lobster *Panulirus-Longipes-Cygnus* George. *Tetrahedron Letters*, 1543-1546.
- EDMONDS J.S., FRANCESCONI K.A., STICK R.V., (1993): Arsenic Compounds from Marine Organisms. *Natural Product Reports*, **10**, 421-428.
- EDMONDS J.S., SHIBATA Y., PRINCE R.I.T., FRANCESCONI K.A., MORITA M., (1994): Arsenic Compounds in Tissues of the Leatherback Turtle, *Dermochelys-Coriacea*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **74**, 463-466.
- EDMONDS J.S., SHIBATA Y., FRANCESCONI K.A., RIPPINGALE R.J., MORITA M., (1997): Arsenic transformations in short marine food chains studied by HPLC-ICP MS. *Applied Organometallic Chemistry*, **11**, 281-287.
- FEKETE J., (2003): Folyadékkromatográfia
- FELDMANN J., LAI V.W.M., CULLEN W.R., MA M.S., LU X.F., et al., (1999): Sample preparation and storage can change arsenic speciation in human urine. *Clinical Chemistry*, **45**, 1988-1997.
- FODOR P., BARNES R.M., (1983): Determination of Some Hydride-Forming Elements in Urine by Resin Complexation and Inductively Coupled Plasma Atomic Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, **38**, 229-243.
- FRANCESCONI K.A., MICKS P., STOCKTON R.A., IRGOLIC K.J., (1985): Quantitative-Determination of Arsenobetaine, the Major Water-Soluble Arsenical in 3 Species of Crab, Using High-Pressure Liquid-Chromatography and an Inductively Coupled Argon Plasma Emission Spectrometer as the Arsenic-Specific Detector. *Chemosphere*, **14**, 1443-1453.
- FRANCESCONI K.A., EDMONDS J.S., (1993): Arsenic in the sea. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, **31**, 111-151.
- FRANCESCONI K.A., EDMONDS J.S., 1997: Arsenic and marine organisms. *Advances in Inorganic Chemistry*, Vol. 44, 147-189.
- FRANCESCONI K.A., EDMONDS J.S., (1998): Arsenic species in marine samples. *Croatica Chemica Acta*, **71**, 343-359.
- FRANCESCONI K.A., KHOKIATTIWONG S., GOESSLER W., PEDERSEN S.N., PAVKOV M., (2000): A new arsenobetaine from marine organisms identified by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical Communications*, 1083-1084.
- FRANCESCONI K.A., (2002a): Applications of liquid chromatography-electrospray ionization-single quadrupole mass spectrometry for determining arsenic compounds in biological samples. *Applied Organometallic Chemistry*, **16**, 437-445.
- FRANCESCONI K.A., KUEHNELT D., 2002b: Arsenic compounds in the environment. *Environmental Chemistry of Arsenic*, Frankenberger W. T. J., Ed., Marcel Dekker, 51-94.
- FRICKE M.W., CREED P.A., PARKS A.N., SHOEMAKER J.A., SCHWEGEL C.A., et al., (2004): Extraction and detection of a new arsine sulfide containing arsenosugar in molluscs by IC-ICP-MS and IC-ESI-MS/MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **19**, 1454-1459.
- GALLAGHER P.A., SCHWEGEL C.A., WEI X.Y., CREED J.T., (2001): Speciation and preservation of inorganic arsenic in drinking water sources using EDTA with IC separation and ICP-MS detection. *Journal of Environmental Monitoring*, **3**, 371-376.
- GEISZINGER A., GOESSLER W., KOSMUS W., (2002a): Organoarsenic compounds in plants and soil on top of an ore vein. *Applied Organometallic Chemistry*, **16**, 245-249.
- GEISZINGER A.E., GOESSLER W., FRANCESCONI K.A., (2002b): Biotransformation of arsenate to the tetramethylarsonium ion in the marine polychaetes *Nereis diversicolor* and *Nereis virens*. *Environmental Science & Technology*, **36**, 2905-2910.

- GOESSLER W., RUDORFER A., MACKEY E.A., BECKER P.R., IRGOLIC K.J., (1998): Determination of arsenic compounds in marine mammals with high-performance liquid chromatography and an inductively coupled plasma mass spectrometer as element-specific detector. *Applied Organometallic Chemistry*, **12**, 491-501.
- GOESSLER W., PAVKOV M., (2003): Accurate quantification and transformation of arsenic compounds during wet ashing with nitric acid and microwave assisted heating. *Analyst*, **128**, 796-802.
- GOMEZ-ARIZA J.L., SANCHEZ-RODAS D., GIRALDEZ I., MORALES E., (2000): Comparison of biota sample pretreatments for arsenic speciation with coupled HPLC-HG-ICP-MS. *Analyst*, **125**, 401-407.
- GONG Z.L., LU X.F., CULLEN W.R., LE X.C., (2001): Unstable trivalent arsenic metabolites, monomethylarsonous acid and dimethylarsinous acid. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **16**, 1409-1413.
- HANSEN H.R., PICKFORD R., THOMAS-OATES J., JASPARS M., FELDMANN J., (2004): 2-dimethylarsinothioyl acetic acid identified in a biological sample: The first occurrence of a mammalian arsiniothioyl metabolite. *Angewandte Chemie-International Edition*, **43**, 337-340.
- HEITKEMPER D.T., VELA N.P., STEWART K.R., WESTPHAL C.S., (2001): Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **16**, 299-306.
- HINDMARSH J.T., (2000): Arsenic, its clinical and environmental significance. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, **13**, 165-172.
- HIRATA S., TOSHIMITSU H., (2005): Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by HPLC-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **383**, 454-460.
- HOWARD A.G., HUNT L.E., (1993): Coupled Photooxidation Hydride AAS Detector for the HPLC of Arsenic Compounds. *Analytical Chemistry*, **65**, 2995-2998.
- HOWARD A.G., (1997): (Boro)hydride techniques in trace element speciation - Invited lecture. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **12**, 267-272.
- IARC, 1987, Arsenic and arsenic compounds (Group 1). In: IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Supplement 7, date accessed: 2003
- INOUE Y., DATE Y., SAKAI T., SHIMIZU N., YOSHIDA K., et al., (1999): Identification and quantification by LC-MS and LC-ICP MS of arsenic species in urine of rats chronically exposed to dimethylarsinic acid (DMAA). *Applied Organometallic Chemistry*, **13**, 81-88.
- IPOLYI I., (2003): Gyakorlati megoldások a speciációs analitika minőségének biztosítására. *Doktori disszertáció, Budapesti Corvinus Egyetem, Alkalmazott Kémia Tanszék*
- JOKAI Z., HEGOCZKI J., FODOR P., (1998): Stability and optimization of extraction of four arsenic species. *Microchemical Journal*, **59**, 117-124.
- KAHN M., RAML R., SCHMEISSER E., VALLANT B., FRANCESCONI K.A., et al., (2005): Two novel thio-arsenosugars in scallops identified with HPLC-ICPMS and HPLC-ESMS. *Environmental Chemistry*, **2**, 171-176.
- KAISE T., OGURA M., NOZAKI T., SAITOH K., SAKURAI T., et al., (1997): Biomethylation of arsenic in an arsenic-rich freshwater environment. *Applied Organometallic Chemistry*, **11**, 297-304.
- KIM M.J., (2001): Separation of inorganic arsenic species in groundwater using ion exchange method. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **67**, 46-51.
- KOCH I., FELDMANN J., WANG L.X., ANDREWES P., REIMER K.J., et al., (1999): Arsenic in the Meager Creek hot springs environment, British Columbia, Canada. *Science of the Total Environment*, **236**, 101-117.
- KOCH I., WANG L.X., OLLSON C.A., CULLEN W.R., REIMER K.J., (2000): The predominance of inorganic arsenic species in plants from Yellowknife, Northwest Territories, Canada. *Environmental Science & Technology*, **34**, 22-26.

- KOCH I., REIMER K.J., BEACH A., CULLEN W.R., GOSDEN A., et al., 2001: Arsenic speciation in fresh-water fish and bivalves. *Arsenic Exposure and Health Effects IV*, Chappel W. R., Abernathy C. O., and Calderon L. R., Eds., Elsevier, 115-123.
- KOHLMEYER U., KUBALLA J., JANTZEN E., (2002): Simultaneous separation of 17 inorganic and organic arsenic compounds in marine biota by means of high-performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **16**, 965-974.
- KUEHNELT D., GOESSLER W., 2003a: Organoarsenic Compounds in the Terrestrial Environment. *Organometallic Compounds in the Environment*, Craig P. J., Ed., John Wiley & Sons Ltd., 223-275.
- KUEHNELT D., GOESSLER W., FRANCESCONI K.A., (2003b): Nitrogen purity influences the occurrence of As<sup>+</sup> ions in high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric analysis of four common arsenosugars. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17**, 654-659.
- KUMAR A.R., RIYAZUDDIN P., (2005): Mechanism of volatile hydride formation and their atomization in hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytical Sciences*, **21**, 1401-1410.
- LAGARDE F., AMRAN M.B., LEROY M.J.F., DEMESMAY C., OLLE M., et al., (1999a): Certification of total arsenic, dimethylarsinic acid and arsenobetaine contents in a tuna fish powder (BCR-CRM 627). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **363**, 18-22.
- LAGARDE F., ASFARI Z., LEROY M.J.F., DEMESMAY C., OLLE M., et al., (1999b): Preparation of pure calibrants (arsenobetaine and arsenocholine) for arsenic speciation studies and certification of an arsenobetaine solution - CRM 626. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **363**, 12-17.
- LAI V.W.M., CULLEN W.R., HARRINGTON C.F., REIMER K.J., (1997): The characterization of arsenosugars in commercially available algal products including a Nostoc species of terrestrial origin. *Applied Organometallic Chemistry*, **11**, 797-803.
- LARSEN B.R., ASTORGA-LLORENS C., FLORENCIO M.H., BETTENCOURT A.M., (2001): Fragmentation pathways of organoarsenical compounds by electrospray ion trap multiple mass spectrometry (MS6). *Journal of Chromatography A*, **926**, 167-174.
- LARSEN E.H., PRITZL G., HANSEN S.H., (1993): Arsenic Speciation in Seafood Samples with Emphasis on Minor Constituents - an Investigation Using High-Performance Liquid-Chromatography with Detection by Inductively-Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **8**, 1075-1084.
- LARSEN E.H., QUETEL C.R., MUNOZ R., FIALAMEDIONI A., DONARD O.F.X., (1997): Arsenic speciation in shrimp and mussel from the Mid-Atlantic hydrothermal vents. *Marine Chemistry*, **57**, 341-346.
- LARSEN E.H., (1998a): Method optimization and quality assurance in speciation analysis using high performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, **53**, 253-265.
- LARSEN E.H., HANSEN M., GOSSLER W., (1998b): Speciation and health risk considerations of arsenic in the edible mushroom laccaria amethystina collected from contaminated and uncontaminated locations. *Applied Organometallic Chemistry*, **12**, 285-291.
- LAWRENCE J.F., MICHALIK P., TAM G., CONACHER H.B.S., (1986): Identification of Arsenobetaine and Arsenocholine in Canadian Fish and Shellfish by High-Performance Liquid-Chromatography with Atomic-Absorption Detection and Confirmation by Fast-Atom-Bombardment Mass-Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **34**, 315-319.
- LE S.X.C., CULLEN W.R., REIMER K.J., (1994): Speciation of Arsenic Compounds in Some Marine Organisms. *Environmental Science & Technology*, **28**, 1598-1604.
- LE X.C., CULLEN W.R., REIMER K.J., (1992): Decomposition of Organoarsenic Compounds by Using a Microwave-Oven and Subsequent Determination by Flow-Injection Hydride

- Generation Atomic-Absorption Spectrometry. *Applied Organometallic Chemistry*, **6**, 161-171.
- LE X.C., MA M.S., (1997): Speciation of arsenic compounds by using ion-pair chromatography with atomic spectrometry and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, **764**, 55-64.
- LE X.C., MA M.S., (1998): Short-column liquid chromatography with hydride generation atomic fluorescence detection for the speciation of arsenic. *Analytical Chemistry*, **70**, 1926-1933.
- LE X.C., LU X.F., MA M.S., CULLEN W.R., APOSHIAN H.V., et al., (2000a): Speciation of key arsenic metabolic intermediates in human urine. *Analytical Chemistry*, **72**, 5172-5177.
- LE X.C., YALCIN S., MA M.S., (2000b): Speciation of submicrogram per liter levels of arsenic in water: On-site species separation integrated with sample collection. *Environmental Science & Technology*, **34**, 2342-2347.
- LEERMAKERS M., BAEYENS W., DE GIETER M., SMEDTS B., MEERT C., et al., (2006): Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **25**, 1-10.
- LEONHARD P., PEPELNIK R., PRANGE A., YAMADA N., YAMADA T., (2002): Analysis of diluted sea-water at the ng L<sup>-1</sup> level using an ICP-MS with an octopole reaction cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **17**, 189-196.
- LI W.H., WEI C., ZHANG C., VAN HULLE M., CORNELIS R., et al., (2003): A survey of arsenic species in chinese seafood. *Food and Chemical Toxicology*, **41**, 1103-1110.
- LINTSCHINGER J., SCHRAMEL P., HATALAK-RAUSCHER A., WENDLER I., MICHALKE B., (1998): A new method for the analysis of arsenic species in urine by using HPLC-ICP-MS. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **362**, 313-318.
- MA M.S., LE X.C., (1998): Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation. *Clinical Chemistry*, **44**, 539-550.
- MADSEN A.D., GOESSLER W., PEDERSEN S.N., FRANCESCONI K.A., (2000): Characterization of an algal extract by HPLC-ICP-MS and LC-electrospray MS for use in arsenosugar speciation studies. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **15**, 657-662.
- MAEDA S., 1994: Biotransformation of arsenic in the marine environment. *Arsenic in the environment, Part I: Cycling and characterization*, Nriagu J. O., Ed., John Wiley & Sons, 221-261.
- MANDAL B.K., OGRA Y., SUZUKI K.T., (2001): Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India. *Chemical Research in Toxicology*, **14**, 371-378.
- MANDAL B.K., SUZUKI K.T., (2002): Arsenic round the world: a review. *Talanta*, **58**, 201-235.
- MATSUTO S., STOCKTON R.A., IRGOLIC K.J., (1986): Arsenobetaine in the red crab, *Chionoecetes opilio*. *The Science of The Total Environment*, **48**, 133-140.
- MCKIERNAN J.W., CREED J.T., BROCKHOFF C.A., CARUSO J.A., LORENZANA R.M., (1999): A comparison of automated and traditional methods for the extraction of arsenicals from fish. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **14**, 607-613.
- MCSHEEHY S., POHL P.L., LOBINSKI R., SZPUNAR J., (2001): Investigation of arsenic speciation in oyster test reference material by multidimensional HPLC-ICP-MS and electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS-MS). *Analyst*, **126**, 1055-1062.
- MCSHEEHY S., POHL P., VELEZ D., SZPUNAR J., (2002): Multidimensional liquid chromatography with parallel ICP MS and electrospray MS/MS detection as a tool for the characterization of arsenic species in algae. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **372**, 457-466.
- MCSHEEHY S., MESTER Z., (2003): The speciation of natural tissues by electrospray-mass spectrometry. I: Biosynthesized species, As and Se. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **22**, 210-224.

- MESTER Z., FODOR P., (1996): High-performance liquid chromatography hydride generation atomic fluorescence spectroscopic determination of arsenic species in water. *Journal of Chromatography A*, **756**, 292-299.
- MESTER Z., FODOR P., (1997): Analytical system for arsenobetaine and arsenocholine speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **12**, 363-367.
- MIGUENS-RODRIGUEZ M., PICKFORD R., THOMAS-OATES J.E., PERGANTIS S.A., (2002): Arsenosugar identification in seaweed extracts using high-performance liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **16**, 323-331.
- MOLDOVAN M., GOMEZ M.M., PALACIOS M.A., CAMARA C., (1998): Arsenic speciation in water and human urine by HPLC-ICP-MS and HPLC-MO-HG-AAS. *Microchemical Journal*, **59**, 89-99.
- MORITA M., SHIBATA Y., (1990): Chemical Form of Arsenic in Marine Macroalgae - Review. *Applied Organometallic Chemistry*, **4**, 181-190.
- NAKAZATO T., TANIGUCHI T., TAO H., TOMINAGA M., MIYAZAKI A., (2000): Ion-exclusion chromatography combined with ICP-MS and hydride generation-ICP-MS for the determination of arsenic species in biological matrices. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **15**, 1546-1552.
- NAKAZATO T., TAO H., TANIGUCHI T., ISSHIKI K., (2002): Determination of arsenite, arsenate, and monomethylarsonic acid in seawater by ion-exclusion chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry using reaction cell and hydride generation techniques. *Talanta*, **58**, 121-132.
- NISCHWITZ V., PERGANTIS S.A., (2005): First report on the detection and quantification of arsenobetaine in extracts of marine algae using HPLC-ES-MS/MS. *Analyst*, **130**, 1348-1350.
- NISCHWITZ V., KANAKI K., PERGANTIS S.A., (2006a): Mass spectrometric identification of novel arsiniothiyl-sugars in marine bivalves and algae. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **21**, 33-40.
- NISCHWITZ V., PERGANTIS S.A., (2006b): Optimisation of an HPLC selected reaction monitoring electrospray tandem mass spectrometry method for the detection of 50 arsenic species. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **21**, 1277-1286.
- PALACIOS M.A., GOMEZ M., CAMARA C., LOPEZ M.A., (1997): Stability studies of arsenate, monomethylarsonate, dimethylarsinate, arsenobetaine and arsenocholine in deionized water, urine and clean-up dry residue from urine samples and determination by liquid chromatography with microwave-assisted oxidation-hydride generation atomic absorption spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, **340**, 209-220.
- PEDERSEN S.N., FRANCESCONI K.A., (2000): Liquid chromatography electrospray mass spectrometry with variable fragmentor voltages gives simultaneous elemental and molecular detection of arsenic compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **14**, 641-645.
- PERGANTIS S.A., FRANCESCONI K.A., GOESSLER W., THOMASOATES J.E., (1997): Characterization of arsenosugars of biological origin using fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **69**, 4931-4937.
- PERGANTIS S.A., WANGKARN S., FRANCESCONI K.A., THOMAS-OATES J.E., (2000): Identification of arsenosugars at the picogram level using nanoelectrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **72**, 357-366.
- POHL P., (2004): Hydride generation - recent advances in atomic emission spectrometry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **23**, 87-101.
- RAML R., GOESSLER W., TRAAR P., OCHI T., FRANCESCONI K.A., (2005): Novel thioarsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar, 2',3'-dihydroxypropyl 5-deoxy-5-dimethylarsinoyl-beta-D-ribose. *Chemical Research in Toxicology*, **18**, 1444-1450.
- RAML R., GOESSLER W., FRANCESCONI K.A., (2006): Improved chromatographic separation of thio-arsenic compounds by reversed-phase high performance liquid



- chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1128**, 164-170.
- RITSEMA R., DUKAN L., NAVARRO T.R.I., VAN LEEUWEN W., OLIVEIRA N., et al., (1998): Speciation of arsenic compounds in urine by LC-ICP MS. *Applied Organometallic Chemistry*, **12**, 591-599.
- ROIG-NAVARRO A.F., MARTINEZ-BRAVO Y., LOPEZ F.J., HERNANDEZ F., (2001): Simultaneous determination of arsenic species and chromium(VI) by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **912**, 319-327.
- SAKAI T., INOUE Y., DATE Y., AOYAMA T., YOSHIDA K., et al., (2001): Simultaneous determination of neutral, anionic and cationic compounds within one chromatographic run using an inductively coupled plasma mass spectrometer as element-specific detector. *Applied Organometallic Chemistry*, **15**, 285-290.
- SANCHEZ-RODAS D., GEISZINGER A., GOMEZ-ARIZA J.L., FRANCESCONI K.A., (2002): Determination of an arsenosugar in oyster extracts by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and liquid chromatography-ultraviolet photo-oxidation-hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Analyst*, **127**, 60-65.
- SANZ E., MUNOZ-OLIVAS R., CAMARA C., (2005a): A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe. *Analytica Chimica Acta*, **535**, 227-235.
- SANZ E., MUNOZ-OLIVAS R., CAMARA C., (2005b): Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples. *Journal of Chromatography A*, **1097**, 1-8.
- SCHMEISSER E., RAML R., FRANCESCONI K.A., KUEHNELT D., LINDBERG A.L., et al., (2004): Thio arsenosugars identified as natural constituents of mussels by liquid chromatography mass spectrometry. *Chemical Communications*, 1824-1825.
- SCHOOF R.A., YOST L.J., EICKHOFF J., CRECELIUS E.A., CRAGIN D.W., et al., (1999): A market basket survey of inorganic arsenic in food. *Food and Chemical Toxicology*, **37**, 839-846.
- SCOOP Task 3.2.11 2004. Assessment of the dietary exposure of arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States, Final Report, Directorate-General Health and Consumer Protection, EU, Brussels
- SHIBATA Y., MORITA M., (1989): Speciation of Arsenic by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass-Spectrometry. *Analytical Sciences*, **5**, 107-109.
- SHIOMI K., KAKEHASHI Y., YAMANAKA H., KIKUCHI T., (1987). *Applied Organometallic Chemistry*, **1**, 177.
- SHIOMI K., AOYAMA M., YAMANAKA H., KIKUCHI T., (1988): Chemical Forms of Arsenic in Sponges, Sea-Anemones and Sea Hare. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, **90**, 361-365.
- SHIOMI K., SUGIYAMA Y., SHIMAKURA K., NAGASHIMA Y., (1995): Arsenobetaine as the Major Arsenic Compound in the Muscle of 2 Species of Fresh-Water Fish. *Applied Organometallic Chemistry*, **9**, 105-109.
- SLEJKOVEC Z., BYRNE A.R., SMODIS B., ROSSBACH M., (1996): Preliminary studies on arsenic species in some environmental samples. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **354**, 592-595.
- SLEJKOVEC Z., VAN ELTEREN J.T., BYRNE A.R., (1999): Determination of arsenic compounds in reference materials by HPLC-(UV)-HG-AFS. *Talanta*, **49**, 619-627.
- SLEJKOVEC Z., BAJC Z., DOGANOC D.Z., (2004): Arsenic speciation patterns in freshwater fish. *Talanta*, **62**, 931-936.

- SLOTH J.J., LARSEN E.H., JULSHAMN K., (2003): Determination of organoarsenic species in marine samples using gradient elution cation exchange HPLC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **18**, 452-459.
- SLOTH J.J., LARSEN E.H., JULSHAMN K., (2005): Report on three aliphatic dimethylarsinoyl compounds as common minor constituents in marine samples. An investigation using high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19**, 227-235.
- SMEDLEY P.L., KINNIBURGH D.G., (2002): A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, **17**, 517-568.
- SOEROES C., GOESSLER W., FRANCESCONI K.A., KIENZL N., SCHAEFFER R., et al., (2005a): Arsenic speciation in farmed Hungarian freshwater fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 9238-9243.
- SOEROES C., GOESSLER W., FRANCESCONI K.A., SCHMEISSER E., RAML R., et al., (2005b): Thio arsenosugars in freshwater mussels from the Danube in Hungary. *Journal of Environmental Monitoring*, **7**, 688-692.
- SOROS C., BODO E.T., FODOR P., MORABITO R., (2003): The potential of arsenic speciation in molluscs for environmental monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **377**, 25-31.
- SÖRÖS C., (2006): Mérési eljárás kidolgozása és alkalmazása környezeti minták arzénspeciációs elemzésére, *Doktori disszertáció, Budapesti Corvinus Egyetem, Alkalmazott Kémia Tanszék*
- STOCKTON R.A., IRGOLIC K.J., (1979): Hitachi Graphite Furnace Zeeman Atomic-Absorption Spectrometer as an Automated, Element-Specific Detector for High-Pressure Liquid Chromatography - Separation of Arsenobetaine, Arsenocholine and Arsenite-Arsenate. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **6**, 313-319.
- SUN Y.C., LEE Y.S., SHIAH T.L., LEE P.L., TSENG W.C., et al., (2003): Comparative study on conventional and low-flow nebulizers for arsenic speciation by means of microbore liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1005**, 207-213.
- SUNER M.A., DEVESA V., RIVAS I., VELEZ D., MONTORO R., (2000): Speciation of cationic arsenic species in seafood by coupling liquid chromatography with hydride generation atomic fluorescence detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **15**, 1501-1507.
- SUNER M.A., DEVESA V., MUNOZ O., VELEZ D., MONTORO R., (2001): Application of column switching in high-performance liquid chromatography with on-line thermo-oxidation and detection by HG-AAS and HG-AFS for the analysis of organoarsenical species in seafood samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **16**, 390-397.
- SUTTON K.L., HEITKEMPER D.T., 2000: New Approaches for Trace Element Analysis. *Elemental speciation*, Caruso J. A., Sutton K. L., and Ackley K. L., Eds., Elsevier, 501-530.
- SUZUKI K.T., MANDAL B.K., OGRA Y., (2002): Speciation of arsenic in body fluids. *Talanta*, **58**, 111-119.
- TANNER S.D., BARANOV V.I., VOLLKOPF U., (2000): A dynamic reaction cell for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-DRC-MS) - Part III. Optimization and analytical performance. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **15**, 1261-1269.
- THOMAS P., SNIATECKI K., (1995): Determination of Trace Amounts of Arsenic Species in Natural-Waters by High-Performance Liquid-Chromatography Inductively-Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **10**, 615-618.
- TUKAI R., MAHER W.A., MCNAUGHT I.J., ELLWOOD M.J., (2002): Measurement of arsenic species in marine macroalgae by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **457**, 173-185.

- VAHTER M., (1999): Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Science Progress*, **82**, 69-88.
- VAHTER M., (2000): Genetic polymorphism in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity. *Toxicology Letters*, **112**, 209-217.
- VAN HULLE M., ZHANG C., ZHANG X.R., CORNELIS R., (2002): Arsenic speciation in chinese seaweeds using HPLC-ICP-MS and HPLC-ES-MS. *Analyst*, **127**, 634-640.
- VANHOE H., GOOSSENS J., MOENS L., DAMS R., (1994): Spectral Interferences Encountered in the Analysis of Biological-Materials by Inductively-Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **9**, 177-185.
- WAHLEN R., MCSHEEHY S., SCRIVER C., MESTER Z., (2004): Arsenic speciation in marine certified reference materials - Part 2. The quantification of water-soluble arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **19**, 876-882.
- WANGKARN S., PERGANTIS S.A., (2000): High-speed separation of arsenic compounds using narrow-bore high-performance liquid chromatography on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **15**, 627-633.
- WEI H.Y., BROCKHOFF-SCHWEGEL C.A., CREED J.T., (2001): A comparison of urinary arsenic speciation via direct nebulization and on-line photo-oxidation-hydride generation with IC separation and ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **16**, 12-19.
- WEI X.Y., BROCKHOFF-SCHWEGEL C.A., CREED J.T., (2000): Application of sample pre-oxidation of arsenite in human urine prior to speciation via on-line photo-oxidation with membrane hydride generation and ICP-MS detection. *Analyst*, **125**, 1215-1220.
- WHO 1996, Guidelines for Drinking Water Quality, Recommendations, 2nd ed., vol. 2. World Health Organisation Geneva
- WHO, 2001, Arsenic compounds, Environmental Health Criteria 224, 2nd ed. World Health Organisation Geneva
- WOLLER A., MESTER Z., FODOR P., (1995): Determination of Arsenic Species by High-Performance Liquid-Chromatography Ultrasonic Nebulization Atomic Fluorescence Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **10**, 609-613.
- WOLLER A., GARRAUD H., BOISSON J., DORTHE A.M., FODOR P., et al., (1998): Simultaneous speciation of redox species of arsenic and selenium using an anion-exchange microbore column coupled with a micro-concentric nebulizer and an inductively coupled plasma mass spectrometer as detector. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **13**, 141-149.
- WROBEL K., PARKER B., KANNAMKUMARATH S.S., CARUSO J.A., (2002): Determination of As(III), As(V), monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and arsenobetaine by HPLC-ICP-MS: analysis of reference materials, fish tissues and urine. *Talanta*, **58**, 899-907.
- YAMAOKA Y., CARMONA M.L., OCLARIT J.M., JIN K.Z., SHIBATA Y., (2001): Arsenic compounds in marine sponge (*Haliclona permolis*, *Halichondria japonica*, *Halichondria okadai* and *Haliclona* sp white) from Seto Inland Sea, Japan. *Applied Organometallic Chemistry*, **15**, 261-265.
- ZHENG J., GOESSLER W., KOSMUS W., (1998): Speciation of arsenic compounds by coupling high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Mikrochimica Acta*, **130**, 71-79.
- ZHENG J., HINTELMANN H., (2004): Hyphenation of high performance liquid chromatography with sector field inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of ultra-trace level anionic and cationic arsenic compounds in freshwater fish. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **19**, 191-195.

## KÖSZÖNTNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik az elmúlt négy évben segítségemre voltak a doktori munkám során.

Elsősorban témavezetőmnek dr. Fodor Péternek, az Alkalmazott Kémia Tanszék vezetőjének, aki bevezetett a műszeres analitika rejtelmeibe. Szakmai tanácsain túl külföldi ösztöndíjakra és a nemzetközi mezőnyben történő megmérettetésre biztosított lehetőséget számomra.

Külön szeretném megköszönni Dr. Sörös Csillának, aki megosztva velem kromatográfiás és arzénspeciációs tapasztalatait, doktori munkámat elindította és akivel az elmúlt négy év alatt hatékonyan együttműködve tudtam dolgozni.

Szeretném megköszönni továbbá a tanszék valamennyi dolgozójának, illetve doktorandusz társaimnak, hogy szakmai tanácsukkal illetve a kellemes légkör megteremtésével segítették doktori munkámat.

A Karl-Franzens Egyetem (Graz) Kémiai Tanszékének minden dolgozójának, kiemelten Kevin Francesconi, Doris Kuehnelt és Walter Goessler professzoroknak, akik önzetlenül sok-sok szakmai tapasztalatot adtak át számomra.

Dr. Váradi Lászlónak, aki a minták beszerzésében volt segítségemre.

Doktori munkám elvégzéséhez nyújtott anyagi támogatásért köszönettel tartozom továbbá a következő intézményeknek: Magyar Állami Doktori Ösztöndíj, Österreichischer Austauschdienst (ÖAD), QUANAS Project, BCE - Élelmiszertudományi Doktori Iskola

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak a sok türelmet és kitartást, amit az elmúlt négy év alatt tanúsítottak azért, hogy ezt a munkát sikeresen befejezhessem.